

**OBTENCIÓN DE ANDAMIOS DE NANOFIBRAS POR ELECTROHILADO, A BASE DE
QUITOSANO / FIBRA DEL GUSANO DE SEDA (*Bombyx mori*) NATIVOS, PARA
APLICACIONES BIOMÉDICAS**

YESICA CAROLINA CÁRDENAS PÉREZ

Código No. 201011518

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE QUÍMICA

TUNJA

2015

**OBTENCIÓN DE ANDAMIOS DE NANOFIBRAS POR ELECTROHILADO, A BASE DE
QUITOSANO / FIBRA DEL GUSANO DE SEDA (*Bombyx mori*) NATIVOS, PARA
APLICACIONES BIOMÉDICAS**

**Trabajo de grado para optar al título de
QUÍMICO**

YESICA CAROLINA CÁRDENAS PÉREZ

Código No. 201011518

Director:

Dr. Efrén de Jesús Muñoz Prieto

Codirectores:

Dr. Ricardo Vera Graziano

Dr. Edwin Yesid Gómez Pachón

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE QUÍMICA

TUNJA

2015

NOTA DE ACEPTACIÓN

Director

Codirector

Estudiante

Jurado

Jurado

Tunja, Agosto 3 de 2015

DEDICATORIA

*A mi mamita hermosa **Lilia Pérez Acevedo** por ser la mujer más excepcional y maravillosa que conozco, porque me siento orgullosa de ser su hija, por ser mi ejemplo a seguir, por su apoyo incondicional y sacrificio para poder emprender mi viaje a México y hacer realidad ese sueño.*

*A mi padre **Salomón Cárdenas** por ser un apoyo, porque a pesar de todos los altibajos siempre me sentiré orgullosa de contar con su presencia, por cada momento de risas y alegrías, por enseñarme que la vida no es fácil y que cuando se quiere algo se debe forjar para ser cumplido.*

*A mis hermanos **Diana Paola** y **Alexander** y a mi primo **Sebastián Pérez** por su voz de aliento en los momentos difíciles, por sus regaños y confianza en todo momento, por demostrarme que la vida es fácil cuando se quiere, por ser mis modelos de vida a seguir y sobre todo por su apoyo incondicional.*

*A mi tío **Luis Eduardo Pérez** por apoyarme en los momentos difíciles y tratarme como una de sus hijas y jamás decirme que no.*

A todos mis angelitos por guiarme en este camino el cual ha tenido momentos buenos y difíciles, se que de donde estén me apoyan.

Y a todas las personas que en este camino pusieron su granito de arena enseñándome lo valiosa que es la vida y lo feliz que se puede ser.

AGRADECIMIENTOS

A Dios infinitas gracias por permitirme llegar a la culminación de una etapa más de mi vida y a mi hermosa familia por el esfuerzo y apoyo que me brindaron para poder llegar a la culminación de mi carrera.

Al Dr. Efrén de Jesús Muñoz Prieto por permitirme ser parte del grupo de investigación, por sus enseñanzas, confianza, asesoría y hacer posible este proyecto.

Al Dr. Edwin Gómez Pachón por su apoyo, asesoría y tiempo dedicado para la revisión de esta tesis.

Al Dr. Ricardo Vera Graziano, por permitirme trabajar en su laboratorio, por su apoyo tanto académico y personal durante mi estancia en la Universidad Nacional Autónoma de México, por su asesoría y por el tiempo dedicado en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Alfredo Maciel, por recibirme en el laboratorio del IIM, aportándome con sus ideas valiosas para la generación de este proyecto.

A todos mis compañeros y doctores del grupo de polímeros por su gran apoyo, ideas, asesorías, por su acogida durante el desarrollo de este trabajo durante mi estancia en el Instituto de Investigaciones en Materiales en la UNAM.

A Omar Novelo Peralta y Josué Esaú Romero Ibarra por su enorme disposición y gran ayuda en las sesiones de microscopía electrónica de barrido.

A Adriana Tejeda Cruz por su gran apoyo para las pruebas y análisis de difracción de rayos X.

A Damaris Cabrero Palomino por su apoyo en las pruebas de caracterización térmico.

A Miguel Ángel Canseco por su colaboración por los análisis en espectroscopia infrarroja.

Al apoyo financiero brindado por la Dirección de Investigaciones DIN- UPTC a través de proyecto de investigación con el código SGI 1781 de 2015.

Al convenio existente entre la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y el Instituto de Investigaciones en Materiales de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y a todas las personas que conocí en el trascurso de mi carrera y me aportaron en lo personal y académico.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	10
Resumen	11
INTRODUCCIÓN.....	12
1. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL TRABAJO.....	13
1.1 Planteamiento del problema.....	13
1.2. Formulación del problema	13
1.3 Delimitación del problema	13
1.4 Justificación	13
1.5 Objetivos	14
1.5.1 Objetivo General.....	14
1.5.2 Objetivos Específicos	14
2.MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	14
2.1 Marco Teórico.....	14
2.1.1 Electrohilado.....	14
2.1.2 Fibra del capullo del gusano de seda (<i>Bombyx mori</i>).....	17
2.2.3 Quitosano.....	19
2.2 Estado del Arte.....	20
2.2.1 Técnicas de fabricación de andamios celulares.....	20
2.2.2 Materiales usados para la fabricación de andamios en ingeniería de tejidos.	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Materiales.....	22
3.2 Métodos.....	22
3.2.1 Extracción de la fibroína del capullo del gusano de seda	22
3.2.2 Preparación de la solución de fibroína del capullo del gusano de seda y quitosano.	23
3.2.3 Preparación de soluciones para electrohilado.....	23
3.2.4 Electrohilado de soluciones.....	24
3.2.5 Optimización de parámetros de electrohilado de QS: FGS	24

	Pág.
3.2.6 Análisis químico, físico y térmico del capullo del gusano de seda (<i>Bombyx mori</i>), fibroína, quitosano y andamios de nanofibras de QS/FGS.....	25
3.2.7 Entrecruzamiento de nanofibras.....	27
3.2.8 Liofilización del andamio de QS/FGS con glutaraldehído.....	27
3.2.9 Determinación de la Citocompatibilidad <i>in vitro</i> de los andamios QS/FGS.	27
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	28
4.1 Solubilidad de la fibroína del capullo del gusano de seda y quitosano.	28
4.2. Resultados de la caracterización química, física y térmica del capullo del gusano de seda (<i>Bombyx mori</i>), fibroína, quitosano y andamio de nanofibras de QS/FGS	29
4.2.1 Caracterización morfológica por microscopía electrónica de barrido SEM	29
4.4.2 Grupos funcionales mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	38
4.4.3 Cristalinidad por difracción de rayos X (XRD).	40
4.4.4 Temperatura de cambio de masa por análisis termogravimétrico (TGA).	42
4.4.5 Temperatura de transición por calorimetría diferencial de barrido (DSC)	44
4.4.8 Determinación de la citocompatibilidad <i>in vitro</i> de los andamios QS/FGS.....	45
4.4.9 Posibles aplicaciones en biomedicina del andamio QS/FGS.....	46
CONCLUSIONES.....	47
RECOMENDACIONES.....	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Ensamblaje del sistema de electrohilado	15
Figura 2: Equipo de electrohilado del instituto de Investigaciones en Materiales (IIM-UNAM).	15
Figura 3: Capullos del gusano de seda (<i>Bombyx mori</i>).	17
Figura 4: Estructura general de la fibroína.....	18
Figura 5: Estructura general de quitosano.....	19
Figura 6: Descripción del análisis estructural sobre capullo del gusano de seda (<i>Bombyx mori</i>), fibroína, quitosano y de los andamios de nanofibras.	25
Figura 7: Siembra de células mesenquimales en el andamio de QS/FGS.	28
Figura 8: Micrografías por SEM del capullo del gusano de seda (a) 1000X y fibroína (b) 500X.	29
Figura 9: Variación de parámetros para obtener un andamio en relación en peso QS/FGS (3:1).	31
Figura 10: Variación de parámetros para obtener un andamio en relación en peso QS/FGS (1:1).	33
Figura 11: Variación de parámetros para obtener un andamio en relación en peso QS/FGS (1:3).	34
Figura 12: Micrografías por SEM de andamios QS/FGS a 50000X de nanofibras en relación en peso (a) QS/FGS (3:1), (b) QS/FGS (1:1) y (c) QS/FGS (1:3).	35
Figura 13: Efecto del diámetro en las nanofibras del andamio QS/ FGS a diferentes relaciones en peso (3:1), (1:1) y (1:3).	36
Figura 14: Micrografías por SEM de andamios QS/FGS a 10000X de nanofibras en relación en peso (a) QS/FGS (3:1), (b) QS/FGS (1:1) y (c) QS/FGS (1:3).	37
Figura 15: Comparación entre los espectros de infrarrojo del capullo del gusano de seda (a), fibroína (b), quitosano (c) y andamio de QS/FGS (d).	38
Figura 16: Patrones de difracción de rayos X de capullo del gusano de seda (a), fibroína (b), quitosano (c) y andamio QS/FGS (d).	40
Figura 17: TGA de Capullo del gusano de seda (a), fibroína (b), quitosano (c) y andamio QS/FGS(d).	42
Figura 18: DSC de Capullo del gusano de seda (a), fibroína (b), quitosano (c) y andamio QS/FGS(d).	44
Figura 19: Ensayo de viabilidad celular de fluorescencia de dos colores tomadas a dos días de cultivo celular, andamio QS/FGS (a) y control positivo de la formación celular (b)46	46

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Solventes de fibroína del capullo del gusano de seda [47].	23
Tabla 2: Soluciones para electrohilado.	23
Tabla 3: Parámetros propuestos para electrohilado.	25
Tabla 4: Determinación del diámetro y porosidad de capullo del gusano de seda y fibroína.	30
Tabla 5: Determinación del diámetro y porosidad del andamio QS/FGS a diferente relación en peso	35
Tabla 6: Posición de las bandas de absorción infrarrojas de quitosano.	39
Tabla 7: Resultado de la indexación del capullo de gusano de seda, fibroína, quitosano.	41
Tabla 8: Pérdida de peso y temperatura de capullos de gusano de seda, fibroína, quitosano y andamio QS/FGS.	43
Tabla 9: Datos de T_g , T_c y T_f obtenidas de los termogramas de DSC para las muestras de capullo de gusano de seda, fibroína, quitosano y andamio QS/FGS.	44

LISTA DE ABREVIATURAS

Fibroína del gusano de seda	FGS
Quitosano	QS
Matriz extracelular	MEC
Ácido Fórmico	FA
Diclorometano	DCM
Ácido Trifluoroacético	TFA
1,1,1,3,3,3 -Hexafluoro-2-propanol	HFIP
2,2,2-trifluoroetanol	TFE
Glutaraldehído	GTA
Micrografía electrónica de barrido	SEM
Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier	FTIR
Difracción de rayos X	XRD
Análisis termogravimétrico	TGA
Calorimetría diferencial de barrido	DSC
Unidades arbitrarias	U.A.
Instituto de Investigaciones en Materiales	IIM

Resumen

Recientes estudios han conducido al desarrollo de andamios de nanofibras a base de polímeros degradables obtenidos mediante la técnica de electrohilado, para su aplicación en el campo de la ingeniería de tejidos. El uso efectivo de estos andamios poliméricos no solo se basa en la obtención de nanofibras, sino en poder imitar la estructura física de la matriz extracelular y las características bioquímicas del material usado.

En este trabajo se prepararon nanofibras de quitosano (QS) y fibroína del capullo del gusano de seda (FGS), con el fin de crear un andamio con propiedades biocompatibles, biodegradables y biológicas adecuadas para el crecimiento y adhesión celular. La fibroína fue extraída del capullo del gusano de seda (*Bombyx mori*), mediante un tratamiento termoquímico y el quitosano fue proporcionado por la casa comercial sigma aldrich. Se prepararon las nanofibras mediante la técnica de electrohilado donde se determinaron parámetros como solubilidad de los polímeros, relación en peso QS/FGS, velocidad de flujo de inyección, voltaje, distancia del capilar al colector. Se caracterizó de acuerdo a sus propiedades morfológicas, estructurales y térmicas, por microscopia electrónica de barrido (SEM), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (XRD), análisis termogravimétrico (TGA), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y se realizó la citocompatibilidad in vitro del andamio QS/FGS.

Como resultado se obtuvo un correcto desgomado, así como se encontró que el solvente óptimo es el ácido trifluoroacético para la preparación de nanofibras de QS/FGS, en relación en peso (1:3), con parámetros de flujo de inyección de 0,5 mL/h, voltaje 20 kV y distancia entre el capilar al colector de 12 cm, con fibras de diámetro promedio de 155 nm las cuales ayudan a la adhesión celular. Por medio de un ensayo de viabilidad se encontró que el andamio es estable y no presenta rupturas.

INTRODUCCIÓN

El progreso continuo en la ciencia médica y las tecnologías quirúrgicas han permitido que el tejido o el trasplante de órganos enteros puedan convertirse en posibles opciones para restaurar las funciones nativas de varias partes dañadas del cuerpo humano. La ingeniería de tejidos está dirigida a una comprensión fundamental de las relaciones estructura-función en tejidos de mamíferos normales y patológicos, donde el cuerpo usa sus propios sistemas o algunas veces con la ayuda de sustitutos biológicos como andamios, estos son capaces de regenerar funciones de tejidos espontáneamente imitando las funciones de la matriz extracelular (MEC), la cual es una mezcla compleja de materiales inertes que rodean la mayoría de las células que están en el cuerpo, ordenada en fibras a escala nanométrica en estrecha relación con las células que las secretan [1, 2].

Existiendo diferentes técnicas para fabricar andamios celulares se encuentra el electrohilado el cual es un método sencillo para la producción de fibras a escala nano y micrométrica, debido a su simplicidad, versatilidad y bajo costo [3]. Numerosos polímeros naturales se han utilizado con éxito como materiales de andamiaje para la ingeniería de tejidos [4]. En particular, el quitosano (QS) ha sido considerado como uno de los biopolímeros más prometedores como andamio de ingeniería tisular y vendaje de heridas debido a sus excelentes propiedades biológicas tales como la biodegradabilidad, biocompatibilidad y actividad de curación de heridas [5], otro polímero usado como andamio es la fibroína del gusano de seda (FGS) (*Bombyx mori*), proteína fibrosa atractiva y natural usada para aplicaciones biomédicas debido a su permeabilidad al oxígeno, agua, adhesión celular, características de crecimiento, baja respuesta inflamatoria y alta resistencia a la tracción con la flexibilidad [6].

La mezcla de esta proteína y polisacárido ha sido fabricado como material compuesto para los huesos en la ingeniería de tejidos, debido a que el quitosano es beneficioso para la diferenciación osteogénica, [7]. También se obtuvo diferentes mezclas de fibroína de seda/quitosano con ácido fórmico y se observó que las mezclas que contenían hasta el 30 % de quitosano presentan una estructura fibrosa continua [8].

Este trabajo busca aprovechar las propiedades de polímeros naturales, obteniendo andamios de nanofibras de quitosano (QS)/ fibroína del gusano de seda (FGS) nativa por electrohilado encontrando posibles aplicaciones en biomedicina así como encontrar los parámetros óptimos del sistema como la relación QS: FGS, morfología, tamaño, cristalinidad y estabilidad térmica en su caracterización.

1. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL TRABAJO

1.1 Planteamiento del problema

Los andamios de nanofibras obtenidos por electrohilado se ven afectados por parámetros como la concentración, flujo de inyección, voltaje aplicado, distancia del capilar al colector, temperatura y humedad, comprometiendo la eficiencia de la solución de polímeros idóneos que permitan la regeneración del tejido en forma óptima, ya que estos materiales presentan propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad y actividad antimicrobiana. Por lo tanto, pueden ser usados en potenciales aplicaciones biomédicas como la diversidad de lesiones producidas en la piel, causada por sustancias químicas con formulación no conocida en el mercado.

El desarrollo de este proyecto tiene como hipótesis: En qué medida la mezcla de polímeros de quitosano y fibroína del gusano de seda son compatibles y permiten la obtención de un andamio de nanofibras por la técnica de electrohilado con potencialidad para aplicaciones en la ingeniería de tejidos.

1.2. Formulación del problema

¿Es eficiente el proceso de electrohilado para obtener un andamio biodegradable de nanofibras a base de quitosano (QS)/ fibroína del gusano de seda (*Bombyx mori*) para ser usado en potenciales aplicaciones en biomedicina?

1.3 Delimitación del problema

Por medio de la técnica de electrohilado se obtendrá un andamio de nanofibras a base de quitosano (QS) / fibroína del gusano de seda (*Bombyx mori*) (FGS) con características estructurales, morfológicas, propiedades térmicas y actividad biológica para su posible aplicación en biomedicina.

1.4 Justificación

Encontrando los parámetros de acoplamiento entre quitosano y fibroína del gusano de seda (*Bombyx mori*) se podrían encontrar los factores que permitan el electrohilado de manera que se logren andamios celulares y presenten propiedades idóneas como biodegradabilidad, biocompatibilidad, morfología de fibras con diámetros óptimos y poros para que se presente la adherencia celular y el paso de fluidos vasculares para la entrada de nutrientes y salida de desechos del andamio, funcionando como soporte al simular las funciones de la matriz extracelular en el crecimiento celular. Los resultados de este trabajo colaborarían a tener un andamio que facilite la regeneración de tejidos sin reacciones secundarias y pueda ser usado en potenciales aplicaciones en biomedicina.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

Obtener andamios de nanofibras por electrohilado, a base de quitosano (QS)/ fibroína del gusano de seda (*Bombyx mori*) (FGS) para su potencial aplicación en biomedicina.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Encontrar el solvente y condiciones adecuadas para lograr una solución homogénea de FGS.
- Determinar las condiciones de mezcla física en solución entre el QS y FGS más favorables para la preparación de andamios celulares.
- Parametrizar el proceso de electrohilado para obtener andamios de nanofibras de QS/FGS
- Caracterizar los andamios de nanofibras QS/FGS (*Bombyx mori*) por SEM, XRD, FTIR, TGA y DSC.
- Determinar la actividad biológica *in vitro* de los andamios QS/FGS obtenidos por electrohilado.

2.MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

Se presentan los principios teóricos de la técnica de electrohilado, así como la revisión de la estructura y propiedades de los polímeros de fibroína y quitosano. También se describe las principales aplicaciones en la ingeniería de tejidos de los materiales utilizados con la finalidad de hacer una revisión bibliográfica, permitiendo investigar sobre los métodos de extracción y la viabilidad para la utilización de estos polímeros.

2.1 Marco Teórico

2.1.1 Electrohilado

El electrohilado es un método que permite obtener fibras en diámetros que oscilan entre las micras (μm) y nanómetros (nm), rangos en los que es posible encontrar características únicas, entre las que se encuentran un área superficial muy grande en relación al volumen, compleja estructura porosa, alineamiento a nivel molecular [9]. La técnica fue observada por Rayleigh en 1897, quien evaluó el efecto de inducir cargas eléctricas en chorros de agua, así como la inestabilidad asimétrica del flujo del jet (comportamiento de las gotas de solución en el extremo de un capilar y el comportamiento de los fluidos bajo las fuerzas electroestáticas) [10].

El proceso consiste en la aplicación de un alto potencial eléctrico a una gota colgante de una solución polimérica o un polímero fundido, para formar nano o micro fibras [3]. El montaje para la ejecución de este método figura 1, consta de un capilar a través del cual

debe ser expulsada la solución polimérica por una aguja o cono, una bomba de jeringa utilizada para forzar la solución a través del capilar de diámetro pequeño forzando la formación de una gota colgante en la punta, una fuente de voltaje con polaridad positiva o negativa que posee dos electrodos los cuales deben conectarse uno a la punta metálica por donde sale la solución y otro directamente al plato colector (metal conductor, mandril rotatorio, entre otros) donde se recogen las fibras, las cuales se forman en el trayecto de la punta al colector por evaporación del disolvente [11, 12].

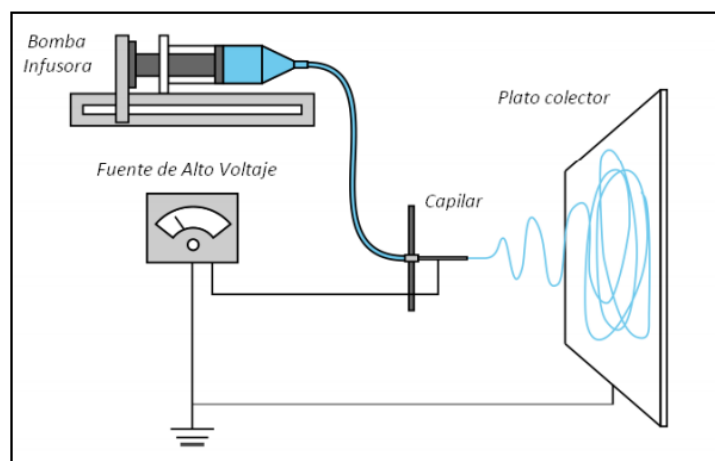


Figura 1: Ensamblaje del sistema de electrohilado

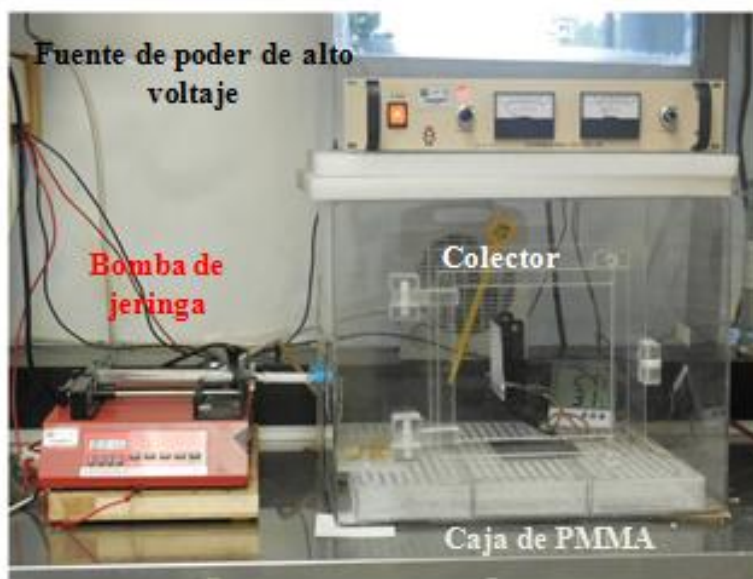


Figura 2: Equipo de electrohilado del instituto de Investigaciones en Materiales (IIM-UNAM).

El aumento de la intensidad de campo eléctrico hace que las interacciones repulsivas entre cargas iguales del líquido y las fuerzas atractivas entre el líquido y el colector de carga opuesta ejerzan fuerzas de tracción sobre el líquido y se dé el alargamiento de la gota en la punta del capilar. Como la intensidad del campo eléctrico se incrementa

adicionalmente se alcanza un punto en el que las fuerzas electrostáticas equilibran la tensión superficial de el líquido, este se conoce como el cono de Taylor [12].

Para el inicio del proceso, el polímero debe estar diluido en el ó los disolventes que permitan una dilución completa del mismo para evitar el taponamiento del capilar, pero que promuevan la obtención de fibras con un diámetro y una porosidad adecuados, la presión de vapor del solvente debe ser tal que se evapore completamente antes de que la fibra llegue al colector, en el trayecto se adelgaza el diámetro de la fibra a escala nanométrica. La viscosidad y la tensión superficial deben ser bajas para que el campo eléctrico pueda convertir la gota en un cono (cono de Taylor) y estirarlo en forma de filamento líquido, pero lo suficientemente altas para evitar que la solución gotee de la punta de la jeringa. La fuente de poder debe generar un campo electromagnético lo suficientemente fuerte para vencer la tensión superficial y la viscosidad de la solución. La distancia entre la jeringa y el colector no debe ser tan pequeña como para formar un arco eléctrico o una chispa pero lo suficientemente grande para que todo el solvente se evapore en el trayecto [13].

2.1.1.1 Parámetros de electrohilado.

2.1.1.1.1 Concentración de la solución: Es un parámetro determinante de tamaño y morfología de las fibras, la concentración influye en la viscosidad y la tensión superficial. La viscosidad de una solución será baja cuando el entrecruzamiento entre las cadenas es menor. El diámetro de las fibras aumenta con la viscosidad; si la solución está muy diluida las fibras del polímero se rompen en gotas antes de llegar al plato colector debido al efecto de la tensión superficial, de igual forma si la solución está muy concentrada entonces las fibras no se podrán formar debido a la alta viscosidad, lo que dificulta el paso de la solución a través del capilar[14].

2.1.1.1.2 Voltaje: Es uno de los parámetros importantes debido a que un voltaje alto permite un mayor estiramiento de la solución debido a la presencia de mayor fuerza de Coulomb en el chorro y un fuerte campo eléctrico, lo que permite la reducción en el diámetro de las fibras [14, 15].

2.1.1.1.3 Flujo de salida: Un flujo de salida menor podría permitir la evaporación del disolvente evitando la formación de defectos en las fibras, cuando el flujo de salida aumenta, el diámetro de las fibras incrementa y posiblemente el tamaño de los defectos [16].

2.1.1.1.3 Distancia del capilar al colector: Dependiendo de las propiedades de la solución el efecto de la variación de la distancia puede o no, tener efecto sobre la morfología de las fibras. Al trabajar con distancias muy grandes las fibras electrohiladas podrían romperse debido a su propio peso, especialmente si las fibras son de diámetro pequeño [17].

2.1.1.1.4 Tipo de colector: Tiene que existir un campo eléctrico entre la jeringa y el colector para que el electrohilado comience. Por lo general se utilizan placas metálicas

como colector, por ejemplo placas de aluminio, para generar una diferencia de potencial estable. Sin embargo también se pueden usar colectores hechos de un material no conductor, lo que hace que se acumule una gran cantidad de carga en el chorro y disminuye la cantidad de nanofibras depositadas.

2.1.1.1.5 Humedad relativa: La humedad del ambiente tiene una gran influencia en la morfología de las nanofibras. Entre más alta sea la humedad es más factible que el agua condense en la superficie de las nanofibras, como consecuencia se afecta de manera significativa el proceso de evaporación del solvente especialmente en solventes orgánicos. A mayor humedad se obtienen superficies más porosas o rugosas. La humedad ambiente impacta en la rapidez con la cual se evapora el o los solventes, sin embargo entre más baja la humedad, es posible que el solvente se evapore tan rápido que en la punta de la jeringa el polímero se solidifique y esta se tape [18].

2.1.2 Fibra del capullo del gusano de seda (*Bombyx mori*).

La seda es una fibra natural de origen animal producida por algunos insectos, larvas de orden lepidóptera que se alimenta de hojas morera e hiladeros adultos de orden artrópodos (arañas). Hay otras especies que pueden hacer seda, tales como las avispas, grillos, larvas de abeja, larvas de escarabajos, ácaros, entre otros [19].

El descubrimiento de la seda (*Bombyx mori*), ocurrió cerca del 2700 A.C en China, la fabricación de seda llegó eventualmente a Europa y América durante los siglos XVIII y XIX. En Colombia el gusano de seda fue introducido por el doctor Manuel Vicente de la Roche, existiendo en el país tres zonas productoras del tejido de seda: la zona cafetera y los departamentos del Cauca y Valle [20].

El gusano de seda (*Bombyx mori*) es un insecto de la familia *Bombycidae*, orden lepidóptero, el cual se transforma de capullo de seda a mariposa figura 3 [21].



Figura 3: Capullos del gusano de seda (*Bombyx mori*).

La fibra de seda se compone en un 97% de proteínas y un 3% de otros componentes como ceras, carbohidratos, pigmentos y compuestos inorgánicos. Las principales proteínas en la fibra de seda son aproximadamente 75% fibroína ($C_{15}H_{23}N_5O_6$) y 25% sericina ($C_{15}H_{25}N_5O_8$) [22].

La fibroína es una glicoproteína hidrofóbica, insoluble en agua, contiene tres subunidades codificadas por un solo gen: la fibroína aislada de glándulas de seda contiene una cadena pesada (H) de 325-395 kDa, una cadena ligera (L) de 25- 26 kDa y la proteína P25 de 30 kDa [23]. El enlace disulfuro entre la Cys-c 20 (vigésimo residuo de la carboxilo terminal) de la cadena pesada y Cys-172 de la cadena ligera mantiene unida a la fibroína y una glicoproteína que no está unida covalente a estas proteínas llamada P25 [24, 25]. Entonces una sola molécula de proteína está formada por una cadena ligera y pesada del dímero. Por lo tanto, seis dímeros están ligeramente unidos a un polipéptido de la subunidad P25 que es una proteína (chaperona) en relación molar H:L:P25 = 6:6:1 [26, 27]. La fibroína, siendo una glicoproteína, tiene un grupo glicosilado N terminal y contiene una cantidad muy pequeña de manosa y glucoamina [28].

La cadena H es el principal responsable de aportar las características fibrosas de la fibra de seda conformada por la secuencia de aminoácidos predominantes (figura 4) en proporción glicina (46%), alanina (30%) y serina (12%) que se encuentran en la cadena. La cadena L no fibrosa contiene principalmente valina, isoleucina, leucina y otros aminoácidos ácidos[29].

La composición y orientación molecular de la proteína, forma una estructura semi-cristalina la cual contiene dos fases: una cristalina altamente ordenada anti paralela de la β -hoja separada por espacios de β -hoja menos ordenada. La parte cristalina contribuye a la resistencia y tenacidad y la parte no cristalina contribuye a la flexibilidad y elasticidad de la fibra [30].

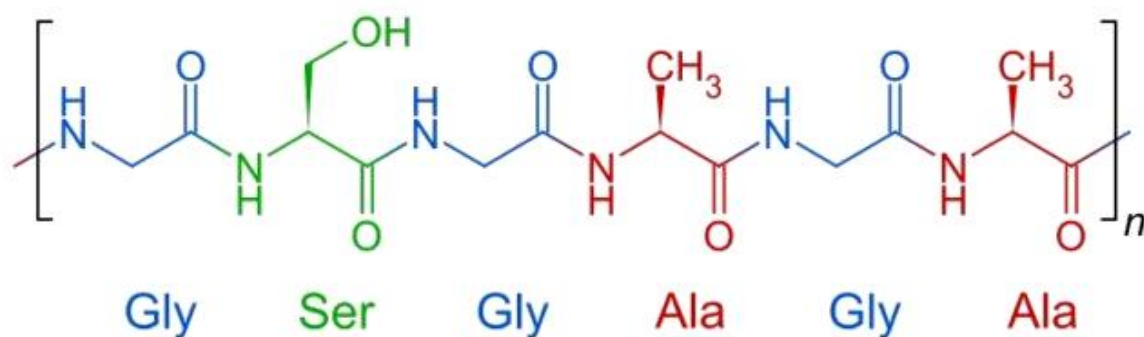


Figura 4: Estructura general de la fibroína.

El filamento de fibroína se encuentra recubierto por una capa de sericina la cual conforma el 25 % de masa del capullo con dos subunidades, es decir α -sericina, encontrado en la capa externa, y la β -sericina, encontrado en la parte interna del capullo. Debido a que la β -sericina tiene menor cantidad de carbono e hidrógeno y mayor cantidad de nitrógeno y oxígeno es menos soluble que la α -sericina [31].

La sericina es una proteína hidrofílica (soluble en agua caliente) por consiguiente, puede ser eliminada o separada de la fibroína mediante un proceso termoquímico simple, conocida como desgomado [32]. Es una proteína amorfa, ayuda a la adhesión de la

fibroína manteniendo la integridad estructural de los capullos, conformada por ácido aspártico, glicina, treonina y serina [30, 33].

La sericina se divide en cuatro capas según su velocidad de disolución en agua o solución alcalina. Entre ellas la primera y la segunda capa se disuelven fácilmente, mientras que la tercera y cuarta capa interior del filamento no se disuelven tan fácilmente. Esta proteína no es soluble por debajo de 20°C, pero cuando la temperatura sube a 60°C, empieza a disolverse la primera y segunda capa. La tercera capa se elimina fácilmente en agua a 83°C, mientras que algunas sericinas insolubles se disuelven a temperatura de 100 °C.

La fibra del gusano de seda (*Bombyx mori*) se destaca por sus propiedades particulares como higroscopía, es decir, en condiciones estándares tiene una resistencia cerca al 11 % y es capaz de absorber hasta el 30 % de su peso en agua, su resistencia es tal que tienen la capacidad de almacenar una energía de 40 KJ/kg. La seda es mala conductora de electricidad y por lo tanto es susceptible a almacenar electricidad estática, tiene baja conductividad térmica, su temperatura de transición vítrea es de aproximadamente 175 °C y su degradación térmica se encuentra cerca de 250 °C, es resistente a la mayoría de ácidos minerales y sensible a medios alcalinos. La seda contiene dos grupos reactivos principales, los amino (-NH₂) y los carboxílicos (-COOH). Es una fibra anfótera, con un punto isoelectrónico cerca de un pH de 5, en esta condición su carga es neutra y por debajo de este pH presenta un carácter catiónico [33].

2.2.3 Quitosano

El quitosano es producto de la desacetilación de la quitina, segundo biopolímero mas abundante en la naturaleza. Se trata de un polisacárido lineal que consiste 2-amino-2desoxi-D-glicopiranososa (GlcN), unido por enlaces glucosídicos β (1 → 4) de manera similar a la celulosa, el quitosano es un polímero de origen natural, biodegradable y no tóxico que se obtiene principalmente de la capa externa de los crustáceos tales como el cangrejo y camarón. Otras fuentes de quitosano son los insectos nematodos y la pared celular de algunos hongos [34].

El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos, la cual llamo "quitina modificada". Más tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe- Seyler quién la denominó como quitosano.

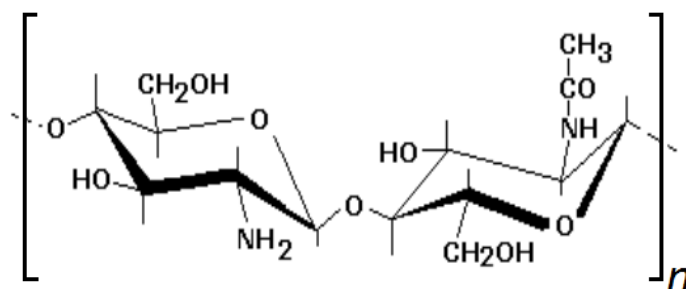


Figura 5: Estructura general de quitosano.

Una de las propiedades del quitosano es el de ser una molécula de tipo catiónico, lo que lo hace tener la capacidad de actuar como floculante, humectante y quelante. Es un biopolímero abundante en la naturaleza, tiene excelente biocompatibilidad, propiedades antibacterianas y de anticorrosión, contiene buenas propiedades físico-químicas y disponibilidad comercial a un costo relativamente bajo [35].

2.2 Estado del Arte

La ingeniería de tejidos y medicina regenerativa tiene como objetivo el desarrollo de sustitutos biológicos que permitan restaurar, recuperar, mantener o mejorar la función de parcial o total de un tejido u órgano completo. Produciendo sustitutos biológicos como andamios que soporten físicamente las células y condiciones como adhesión y crecimiento celular, imitando la matriz extracelular nativa de los tejidos [36]. Los andamios celulares para la regeneración de cualquier tejido, deben presentar características estructurales como alta porosidad y una adecuada relación superficie/volumen, favoreciendo la adhesión celular [37].

Por tal motivo, estos andamios deben ser diseñados para adaptarse a un conjunto de requerimientos. En primer lugar el material debe ser biocompatible, promoviendo el crecimiento celular, la diferenciación y la posibilidad de una orientación tridimensional, con espacio para las células. En segundo lugar, el andamio no debe promover o iniciar una reacción adversa en el tejido. Finalmente, una vez implantado el andamio "*in vivo*" o "*in vitro*", el material debe ser removido mediante degradación o absorción, para dejar solo el tejido nativo [38]

2.2.1 Técnicas de fabricación de andamios celulares

Existen diferentes técnicas para fabricar andamios celulares, tales como: separación de fases, liofilización, electrohilado, entre otras.

La separación de fases consiste en preparar una solución polimérica, seguida de una gelación por enfriamiento, el gel resultante se sumerge en un solvente que es retirado por liofilización quedando una estructura porosa. La liofilización implica enfriar una solución polimérica hasta temperaturas inferiores a la solidificación del sistema, luego el disolvente se elimina por sublimación al vacío en frío, para dejar un sólido poroso que sirve de andamio [39].

El electrohilado es una técnica para producir fibras resistentes debido a su versatilidad, control de diámetro, textura de las fibras y economía del proceso. [3]. El electrohilado es un proceso asistido por una diferencia de potencial entre la punta del inyector que contiene un polímero disuelto. Previamente el polímero se debe disolver en un solvente volátil y polar para que la solución sea conductora. En el trayecto, el solvente se evapora para formar nanofibras sólidas que se depositan en el colector [11, 12]. Las nanofibras

producidas por esta técnica se usan en campos biomédicos como la inmovilización de enzimas, liberación de fármacos y la ingeniería de tejidos [40].

2.2.2 Materiales usados para la fabricación de andamios en ingeniería de tejidos.

Los andamios pueden se pueden obtener a partir de diferentes materiales, incluyendo polímeros biodegradables, cerámicas o materiales compuestos los cuales contienen polímero y fases cerámicas [36].

Los polímeros utilizados en ingeniería de tejidos pueden ser de origen natural o sintéticos o la combinación de ambos; los polímeros naturales presentan ventajas como alta actividad biológica, degradación enzimática e hidrofobicidad [41]. Entre los existentes cabe mencionar proteínas como fibroína del gusano de seda, colágeno, elastina, fibronectina y polisacáridos como el quitosano, alginato, celulosa y ácido hialurónico .

La fibroína estructura central del capullo de gusano de seda (*Bombyx mori*), se ha estudiado como uno de los candidatos para aplicaciones biomédicas, debido a las propiedades biológicas como buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y mínima reacción inflamatoria [25]. Varios métodos han sido propuestos para obtener diferentes andamios en forma de películas, geles y esponjas, entre otros [24].

Se ha logrado que las células endoteliales aórticas humanas y células de músculo liso de la arteria coronaria humana se genere mediante andamios de fibroína de seda por electrohilado para la ingeniería de tejido vascular. Los andamios producidos con esta proteína se encontraron en diferentes diámetros (400, 800 y 1200 nm) y se estudiaron para observar sus efectos de crecimiento y migración de las células neuronales, concluyendo que cuando los diámetros son más pequeños promueven el desarrollo y la maduración de las neuronas donde su diámetro es de 400 +/- 76 nm. También se ha producido estos andamios para el vendaje de heridas y la ingeniería de tejidos utilizando como disolvente ácido fórmico, donde se observa que los diámetros de fibroína de seda variaron entre 30 a 129 nm y su diámetro promedio fue de 80 nm [40].

Esta proteína ha sido combinada con diversos materiales debido a que su estructura no es tóxica. Siendo utilizada con alginato de sodio para biomineralización o tejido de reparación [42]. Esta proteína, por sus excelentes propiedades mecánicas, de flexibilidad, alta biocompatibilidad y fácil proceso de preparación ha sido utilizada con éxito como material de sutura y sistema de administración de fármacos [43]. También se considera como un material que facilita la síntesis de colágeno y la revitalización en el tratamiento de lesiones de la piel; debido a su buena permeabilidad al oxígeno disuelto, característica en situación húmeda comparable a la piel humana.[44].

El quitosano es un polisacárido con propiedades biocompatibles, biodegradables y con carácter antibacteriano ampliamente utilizado para aplicaciones biomédicas tales como apósitos para heridas, portadores de administración de fármacos y como andamio en la ingeniería de tejidos [45]. Debido a la presencia de grupos hidroxilo y aminos se ha utilizado para la eliminación de iones metálicos pesados a partir de soluciones acuosas.

Sin embargo, electrohilar quitosano solo es demasiado difícil porque este presenta una baja solubilidad, poca flexibilidad de las cadenas, alta viscosidad y propiedades mecánicas limitadas. Por lo tanto, se ha mezclado con polímeros tales como el poli (óxido de etileno), poli (alcohol vinílico), celulosa, poli (ácido láctico), poli (caprolactona) y nylon-6 para mejorar las propiedades mecánicas [46].

La mezcla de esta proteína y polisacárido ha sido fabricado como material compuesto para los huesos en la ingeniería de tejidos mediante la técnica de electrohilado, debido a que el quitosano es benéfico para la diferenciación osteogénica, fabricado con éxito con un sistema de disolvente mixto utilizando ácido trifluoroacético y diclorometano [7]. También se produjo diferentes mezclas de fibroína de seda / quitosano con ácido fórmico y se observó que las mezclas que contenían hasta el 30 % de quitosano presentan una estructura fibrosa continua [8].

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se presenta la metodología empleada para alcanzar los objetivos específicos planteados previamente. Se analiza la influencia de factores dominantes en la obtención de andamios por electrohilado como la concentración de la solución precursora, flujo de inyección, voltaje, humedad y temperatura. También se describen las técnicas analíticas empleadas para la caracterización de las nanofibras, las condiciones en que se realizaron las pruebas de laboratorio y las limitaciones encontradas. El estudio se realizó en el Instituto de Investigaciones en Materiales de la Universidad Nacional Autónoma de México.

3.1 Materiales

Los capullos del gusano de seda *Bombyx mori* fueron obtenidos del Centro de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira, el quitosano (QS) (Sigma-Aldrich). Se usaron como disolventes: ácido fórmico (Sigma-Aldrich, 88%), diclorometano (Sigma-Aldrich, 99,8%), ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich, 99%), 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (Sigma-Aldrich, 99%), 2,2,2-trifluoroetanol (Sigma-Aldrich, 99%).

3.2 Métodos

3.2.1 Extracción de la fibroína del capullo del gusano de seda.

Se realizó un proceso de desgomado para obtener fibroína, estructura central del capullo de gusano de seda (*Bombyx mori*) mediante un proceso termoquímico en el cual la fibra de seda se lavó tres veces con agua a 83°C durante 5 horas y se secó a temperatura ambiente por 2 horas este procedimiento se siguió como lo reporta Jiang, H; *et. al*, [47]. Se determinó una correcta extracción, con una comparación entre el capullo del gusano de seda y fibroína, por las diferentes técnicas de caracterización.

3.2.2 Preparación de la solución de fibroína del capullo del gusano de seda y quitosano.

Para la optimización del proceso de electrohilado la selección del solvente es fundamental. Se realizó la prueba la solubilidad de los polímeros en diferentes solventes orgánicos como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Solventes de fibroína del capullo del gusano de seda [48].

Solvente	Temperatura
Ácido Fórmico (FA)	25°C
Diclorometano (DCM)	25°C
Ácido Trifluoroacético (TFA)	25 °C
1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP)	25°C
2,2,2-trifluoroetanol (TFE)	25°C

Para la prueba de solubilidad se colocó en un vial de 5 mL, 0,1g de polímero con 3 mL de solvente en agitación magnética, utilizando una plancha de calentamiento (*IKA® C-MAG óHS7*) a temperatura ambiente durante 10 horas, luego se preparó las soluciones para electrohilar.

3.2.3 Preparación de soluciones para electrohilado.

Con la finalidad de encontrar una solución adecuada para el proceso de electrohilado después de analizar las micrografías de SEM se propuso un esquema experimental mostrado en la tabla 2. En la cual se prepararon tres soluciones en relación en peso de (3:1), (1:1) y (1:3) de QS: FGS con una concentración final de 5% (w del soluto /v del disolvente).

Tabla 2: Soluciones para electrohilado.

Número de solución	Masa FGS (g)	Masa QS (g)	Relación en peso (%p/p)	Disolvente TFA (mL)	Relación w/v (%)
1	0,113	0,037	(3:1)	3	5
2	0,075	0,075	(1:1)	3	5
3	0,037	0,113	(1:3)	3	5

3.2.4 Electrohilado de soluciones.

El proceso de electrohilado consta de los siguientes pasos:

1. Se pesó la cantidad predeterminada de FGS en una balanza analítica (*PioneerTM*) en un vial de 5 mL, posteriormente se añadió el disolvente, la solución se colocó en agitación en una plancha de calentamiento (*IKA[®] C-MAG HS7*) a temperatura de 40°C durante 12 horas. Una vez disuelta la FGS, se añadió QS hasta su disolución.
2. Las soluciones poliméricas fueron transferidas a jeringas de plástico de 5 mL de capacidad, con agujas de 0,8 mm de diámetro. El volumen inyectado fue de 3mL.
3. El equipo y la orientación utilizada para generar las fibras se muestran en la figura 2.
4. Se fijó la jeringa en la bomba de inyección (*New Era Pump Systems, Inc NE-4000*), se programó el flujo y el volumen deseados de solución polimérica.
5. Se colocó una placa colectora de aluminio repujado de 4 mm de espesor y de 8 cm x 8cm, a una distancia aguja-colector establecida.
6. Se conectó un electrodo a la aguja y el otro al colector.
7. Se inyectó la solución de QS/ FGS hasta formar una gota.
8. Se encendió la fuente de poder (*GLASSMAN HIGH VOLTAGE, INC*) y se aplicó el voltaje previamente establecido entre la aguja y el colector y con ello se inicio el proceso de electrohilado.
9. Sobre el colector de aluminio se depositaron las fibras que constituyen el andamio polimérico, se desprendió la placa de aluminio de la base del colector, se etiquetó y se guardó para su posterior caracterización.

3.2.5 Optimización de parámetros de electrohilado de QS: FGS

Las condiciones óptimas de relación en peso QS: FGS, velocidad de flujo, voltaje, distancia del capilar al colector, humedad relativa y temperatura se basaron en el estudio morfológico y se propuso un esquema experimental de optimización mostrado en la tabla 3. Con la finalidad de encontrar las condiciones más adecuadas para obtener fibras con grosor homogéneo y el menor diámetro posible.

Tabla 3: Parámetros propuestos para electrohilado.

Parámetro	Valores propuestos
Relación en peso QS/FGS	(3:1), (1:1) y (1:3)
Velocidad de flujo (mL/h)	0,3; 0,5; 0,6
Voltaje (KV)	18, 20, 22
Distancia del capilar al colector (cm)	9,12, 15
Humedad relativa (%)	20 - 30
Temperatura (°C)	20- 28

3.2.6 Análisis químico, físico y térmico del capullo del gusano de seda (*Bombyx mori*), fibroína, quitosano y andamios de nanofibras de QS/FGS

En la figura 6, se muestra la metodología desarrollada para los análisis del capullo del gusano de seda (*Bombyx mori*), fibroína, quitosano y de los andamios de nanofibras. A continuación se describe cada una de las técnicas analíticas aplicadas.



Figura 6: Descripción del análisis estructural sobre capullo del gusano de seda (*Bombyx mori*), fibroína, quitosano y de los andamios de nanofibras.

3.2.6.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para la caracterización del capullo del gusano de seda, fibroína y andamios de nanofibras se cortaron en trozos pequeños de 0,5 x 0,5 cm y se fijaron con cinta adhesiva sobre portamuestras de aluminio, estas muestras fueron recubiertas con oro por medio de pulverización catódica asistida por plasma con una corriente de 30 mA durante 5 min.

El microscopio electrónico de barrido emplea dos tipos de electrones: secundarios y retrodispersados; los primeros, sirven para obtener una imagen de la apariencia tridimensional de la muestra, mientras que los segundos revelan las diferencias en la composición química. El análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM), se realizó a través de un microscopio JEOL JSM-7600 F, equipado con un filamento de tungsteno (W), donde la diferencia de voltaje suministrada al cañón de electrones fue de 20.0 KV. Se tomaron micrografías en aumentos entre 1000X y 50000X. Con lo anterior, se realizó un procesamiento de las imágenes con el programa de digitalización "Image J". para determinar el diámetro de las fibras, el porcentaje de porosidad de la superficie, la existencia de clústers, rupturas y otros defectos del material obtenido.

3.2.6.2 Características químicas.

3.2.6.2.1 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier es ampliamente usada en investigación y en la industria como una confiable herramienta para realizar mediciones de control de calidad y análisis dinámicos en una amplia variedad de muestras principalmente de carácter orgánico. Las mediciones de los espectros obtenidos de las muestras de capullos del gusano de seda, fibroína, quitosano y del andamio de nanofibras QS/FGS se obtuvieron en el intervalo de $4000-400\text{ cm}^{-1}$, con un espectrómetro FTIR, Thermo Scientific Nicolet 6700 el cual tiene acoplado un accesorio de ATR.

Los análisis fueron realizados directamente sobre las muestras sin previa preparación. Esta técnica se empleó con el fin de determinar la existencia de cambios químicos por efecto de electrohilado, así como para la identificación de compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en las muestras.

3.2.6.2.2 Difracción de rayos X (XRD)

Por medio de la técnica de difracción de rayos X, se determinó la existencia de un ordenamiento y cristalinidad en el capullo del gusano de seda asociado a la presencia de fibroína, quitosano y andamio de nanofibras QS/FGS, en un equipo SIEMENS D-500, usando la radiación de $\text{Cu } K_{\alpha}$ ($\lambda = 0,1542\text{ (\AA)}$) se realizó a diferentes ángulos, con pasos de $0,02^\circ$ por segundo. Para la indexación de datos se utilizó el programa de Diffract Plus 2005.

3.2.6.3 Análisis térmico.

3.2.6.3.1 Análisis termogravimétrico (TGA)

Las curvas termogravimétricas se obtuvieron en un equipo TGA Q5000 IR TA Instruments. Las muestras, aproximadamente de 5 mg, fueron sometidas desde 30 hasta 400°C . a 10°C/min bajo una atmósfera de nitrógeno. A través de esta técnica se determinó la degradación y estabilidad térmica de cada una de las muestras.

3.2.6.3.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las transiciones térmicas del capullo del gusano de seda, fibroína, quitosano y andamio de QS/FGS (electrohiladas) fueron estudiadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC), para determinar los cambios en su estado físico como temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura de cristalización (T_c) y temperatura de fusión (T_f) determinadas por medio de un equipo DSC Q2000 TA Instruments bajo una atmósfera de nitrógeno. Las muestras fueron llevadas hasta 300°C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

3.2.7 Entrecruzamiento de nanofibras

Se realizó un entrecruzamiento en un desecador sellado el cual contenía 10 mL de glutaraldehído (GTA) al 25 % en solución acuosa. El andamio fue colocado en un desecador a temperatura ambiente durante 3 días con el fin de evacuar el disolvente que llevó a aumentar la unión física entre las fibras. Después del entrecruzamiento, se secó las muestras a temperatura ambiente. [49].

3.2.8 Liofilización del andamio de QS/FGS con glutaraldehído

Con el objetivo de aumentar el pH a 7,5, para poder determinar la citocompatibilidad del andamio de QS/FGS con glutaraldehído, se sumergió el andamio en una solución de NaOH al 5 M y se determinó el pH mediante papel indicador y luego se realizó un proceso de sublimación bajando la presión (alrededor de 50 mBar) a temperatura de - 110 °C, se utilizó una liofilizadora LabCoco, se aumentó la temperatura gradualmente hasta que se eliminó el agua intermolecular y el agua intramolecular durante 7 horas.

3.2.9 Determinación de la Citocompatibilidad in vitro de los andamios QS/FGS.

3.2.9.1 Sembrado y cultivo celular en los andamios QS/FGS

Se sembró sobre el andamio QS/FGS células mesenquimales humanas obtenidas del cordón umbilical, se esterilizó el andamio durante 20 minutos con luz ultravioleta U.V, una vez transcurrido el tiempo se colocó en placas multipozos y se le agregó 7 microlitros del medio de cultivo DMEM/F12 suplementado (10% Suero Bovino Fetal y 1% antibiótico) en donde se encontraban suspendidas 7,500 células. La suspensión celular se dejó sobre el andamio durante 40 minutos dentro de una incubadora (37°C, 5% CO₂ y humedad), propiciando que ésta fuera absorbida por el material y las células se adhirieran. Posteriormente, se agregó más medio para mantener las células. La evaluación biológica del materia se realizó en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos, Facultad de Medicina en convenio con el Instituto de Investigaciones en materiales, ambos pertenecientes a la Universidad Nacional Autónoma de México.

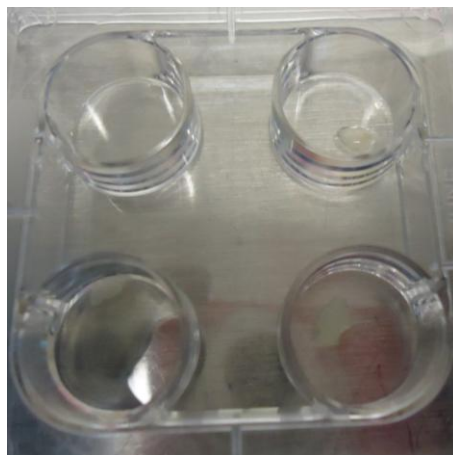


Figura 7: Siembra de células mesenquimales en el andamio de QS/FGS.

3.2.9.2 Viabilidad celular mediante ensayo Live/Dead con calceína - homodímero de etidio.

La viabilidad del andamio QS/FGS, se determinó mediante un ensayo Live/Dead con calceína- homodímero de etidio, en el cual se retiró el medio a evaluar y se le agregó solución salina con fosfato (PBS), la muestra de células se lavó para eliminar o diluir cualquier residuo suplementado, se retiró en PBS con cuidado para no desprender las células, se agregó 0,25 μL de calceína y 0,5 μL de homodímero de etidio al Hanks hasta cubrir el cultivo celular. Se agregó a la mezcla las células mesenquimales y se incubó durante 45 min, se retiró y se lavó dos veces con PBS.

La detección viral se realizó por medio de microscopia de fluorescencia, se utilizó un microscopio Nikon el cual usa una iluminación de alta intensidad para excitar moléculas fluorescentes en la muestra.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se presentan los resultados experimentales obtenidos de las pruebas de laboratorio, por un lado se determinaron las condiciones y el proceso de extracción del capullo del gusano de seda (*Bombyx mori*) y por el otro la parametrización del proceso de electrohilado a estos biopolímeros a diferentes relaciones en peso. Para los dos fines se aplicaron las mismas técnicas analíticas de microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia infrarroja (FTIR), difracción de rayos X (XDR), análisis termogavimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

4.1 Solubilidad de la fibroína del capullo del gusano de seda y quitosano.

Los disolventes utilizados para las soluciones poliméricas tienen una influencia significativa en la capacidad del hilado, por lo tanto, el paso principal del proceso de

electrohilado es la disolución de los polímeros. Los disolventes deben tener propiedades de buena volatilidad, presión de vapor y punto de ebullición, de manera que no afecte la capacidad del hilado de la solución, estructura y propiedades de las fibras electrohiladas.

Después de examinar la solubilidad de quitosano y fibroína en diferentes disolventes orgánicos (tabla 1). Se encontró que la fibroína es una proteína hidrofóbica insoluble en FA, DCM, HFIP y TFE, soluble en TFA a temperatura ambiente, se formó una solución homogénea con un cambio de color blanco a café en la solución. El quitosano es un biopolímero soluble en FA, DCM, DCM y TFA a temperatura ambiente, e insoluble en TFE.

El disolvente adecuado para la disolución entre los dos polímeros es el ácido trifluoroacético, porque presentaban la formación entre las moléculas de TFA y los grupos amino de quitosano y fibroína. La disolución encontrada se produce en dos etapas, la primera es la protonación de los grupos amino ($-NH_2$) a lo largo de la cadena de los polímeros y la segunda es la interacción iónica entre el grupo amino protonado ($-NH_3^+$) y grupos aniónicos del ácido trifluoroacético, disolviendo en su totalidad los polímeros [50].

4.2. Resultados de la caracterización química, física y térmica del capullo del gusano de seda (*Bombyx mori*), fibroína, quitosano y andamio de nanofibras de QS/FGS

A continuación, se presentan los resultados del análisis de esta caracterización:

4.2.1 Caracterización morfológica por microscopia electrónica de barrido SEM

4.2.1.1 Caracterización morfológica del capullo del gusano de seda y fibroína.

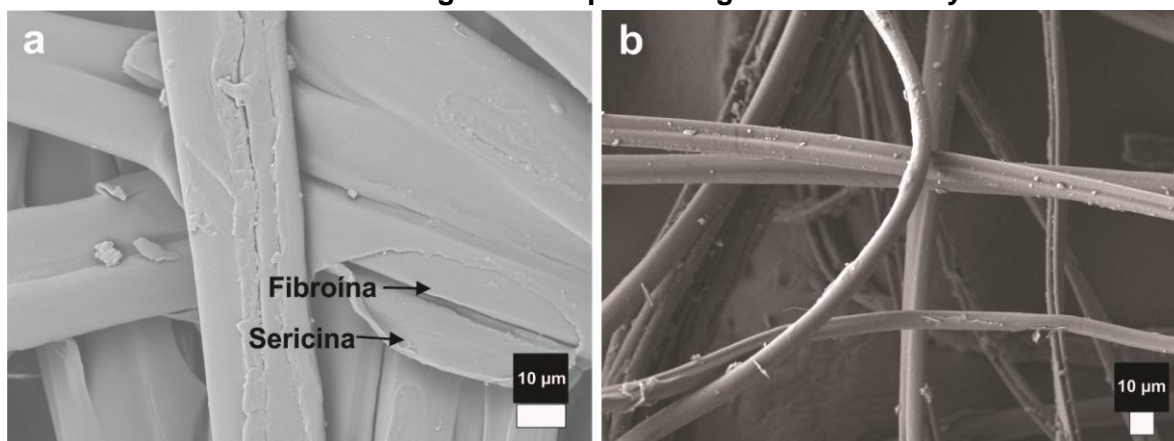


Figura 8: Micrografías por SEM del capullo del gusano de seda (a) 1000X y fibroína (b) 500X.

En la figura 8 se muestran micrografías observadas por SEM del capullo del gusano de seda (*Bombyx mori*) y la fibroína. En la tabla 4, se muestran los resultados de la medición de los diámetros y porosidad del capullo del gusano de seda (*Bombyx mori*) y fibroína estudiados con el programa "Image J".

Tabla 4: Determinación del diámetro y porosidad de capullo del gusano de seda y fibroína.

Muestra	Diámetro promedio (μm)	Porosidad promedio (%)
Capullo del gusano de seda (<i>Bombyx mori</i>)	36 +/- 22	1,0
Fibroína	13 +/- 7	7,6

Se puede observar en el micrografía de SEM en la figura 8 (a) que el capullo del gusano de seda presenta fibras orientadas al azar aplanadas rugosas externamente y se evidencia que cada una de estas fibras presentan filamentos de fibroína recubiertos por sericina. El diámetro promedio de las fibras del capullo de gusano son de 36 +/- 22 μm , lo cual corresponde con los resultados reportados por Yuan, X; *et. al* [51]. En la figura 8 (b), se pueden observar fibras cilíndricas orientadas al azar con diámetros de 13 +/- 7 μm , las cuales corresponden a fibras de fibroína obtenidas después del proceso térmico de desgomado, donde se retiró la sericina debido a que esta es una proteína hidrofílica eliminada por la aplicación de temperaturas superiores a 60°C, los cambios presentados por los valores de diámetro promedio de las fibras (tabla 4) evidencia un correcto desgomado.

También se presenta la estimación del porcentaje de porosidad calculada por el programa Image J, obteniendo para el capullo del gusano de seda y fibroína con una porosidad promedio de 1,0 y 7,6 % respectivamente. Lo cual indica que se presenta mayor porosidad en la micrografía de fibroína (figura 8 b) al retirar la sericina.

4.2.1.2 Caracterización morfológica de los andamios QS/FGS.

Como se mencionó en la metodología, se realizaron diferentes experimentos secuenciales variando cada parámetro con el fin de determinar los efectos y así optimizar la calidad de las nanofibras. Se analizaron los efectos de concentración, flujo de inyección, voltaje aplicado y distancia del capilar al colector

4.2.1.2.1 Parámetros de electrohilado para el andamio en relación en peso QS/FGS (3:1)

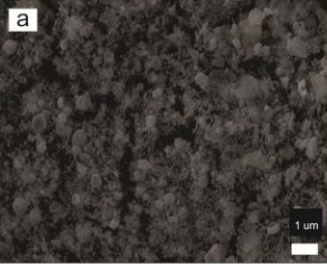
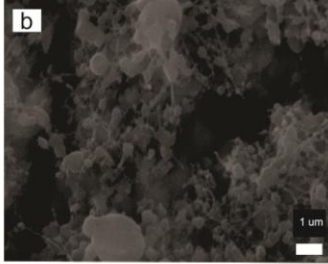

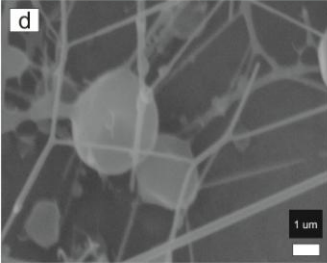
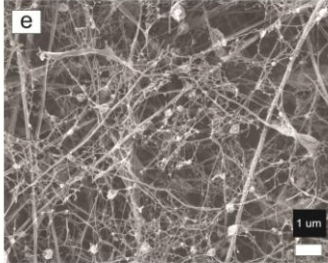
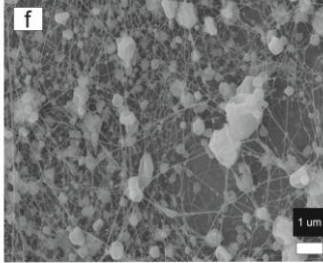
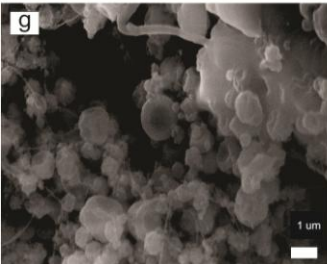
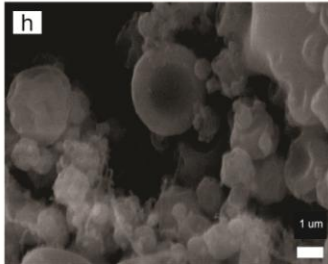
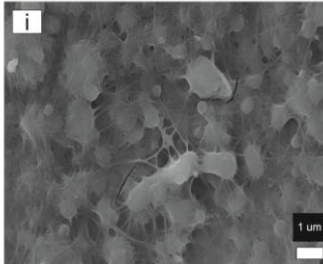
		Voltaje aplicado (KV)		
		18	20	22
Flujo de inyección (mL/h)	0,3			
	0,5			
	0,6			
		9	12	15
		Distancia del capilar al colector (cm)		

Figura 9: Variación de parámetros para obtener un andamio en relación en peso QS/FGS (3:1).

En la figura 9 en las micrografías (**a, b, c, g, h e i**), se puede observar que cuando se utilizó un flujo de inyección de 0,3 y 0,6 mL/h, no hubo formación de fibras, sino gotas muy grandes pegadas entre sí, debido a que se ve influenciado, porque hay una concentración alta de quitosano esto a que se genera una alta viscosidad y es difícil de hilar, por lo tanto no se genera una evaporación de solvente.

Se presentan fibras en la figura 8 (**d, e y f**), hay formación de fibras ya que el flujo de inyección de 0,5 mL/h permite la evaporación del disolvente, pero se evidencian defectos como clúster, aglomeraciones entre nanofibras.

Para iniciar el proceso de electrohilado se aplica un voltaje induciendo carga necesaria en la solución polimérica de QS/FGS en relación en peso 3:1, para que ocurra la formación de fibras se inicia con un voltaje de 15 KV en donde se observa que no hay formación de la gota por lo tanto no electrohila, aumentando progresivamente el voltaje a 18 y 20 KV, se aumenta la fuerza del campo eléctrico y las fuerzas electrostáticas repulsivas en el chorro expulsado, lo que favorece el adelgazamiento de las fibras en la figura 8 (**d, e y f**), en el cual el solvente se evaporó muy despacio presentando residuos en forma de clúster. Sin embargo, cuando el voltaje fue de 22 KV se formaron aglomeraciones poliméricas figura 8 (**c e i**).

Una distancia apropiada es requerida para darles a las fibras tiempo suficiente para secar el disolvente antes de llegar al colector. Por lo tanto, cuando la distancia fue de 9 cm se presenta formación de fibras en la figura 9 (**c**) pero se presentan clúster y gotas, al aumentar la distancia de 12 cm se observan fibras planas y continuas en la figura 9 (**e**). Pero cuando la distancia es de 15 cm no se generan fibras.

Por lo tanto, se observa que para que haya formación de fibras es necesario variar todos los parámetros ya que estos influyen en generar fibras continuas, sin defectos. Para el andamio cuando el quitosano está en mayor proporción respecto a la fibroína se presenta fibras en la figura 9 (**e**) con menor cantidad de clúster, al utilizar parámetros de flujo de inyección de 0,5 mL /h, voltaje aplicado de 20 KV y distancia de capilar al inyector de 12 cm.

4.2.1.2.2 Parámetros de electrohilado para el andamio en relación en peso QS/FGS (1:1)

En la figura 10 se presentan los parámetros utilizados para la formación de nanofibras del andamio QS/FGS en relación en peso 1:1, Se observa que no hay formación de fibras cuando el flujo de inyección es de 0,3 y 0,6 mL/h, el voltaje de 18 y 22 KV y la distancia del capilar al colector 9 y 18 cm figura 10 (**c** y **g**), indicando que no hay evaporación de disolvente. En las figura 9 (**a**, **b**, **d**, **f**, **h**, **e**, **i**), hay formación de fibras pero estas presenta defectos como clúster, rupturas y aplastamiento Por lo tanto, no se genera un andamio homogéneo

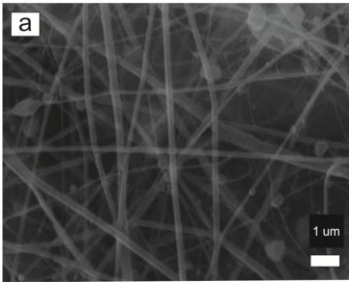
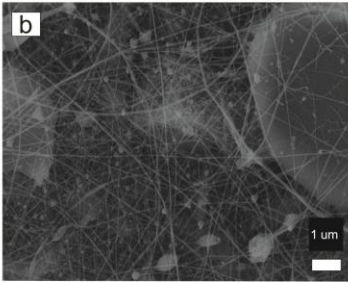
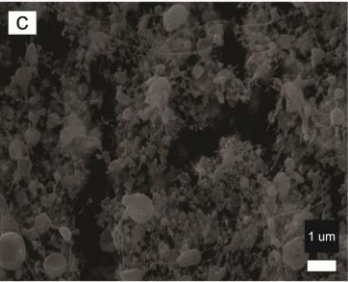
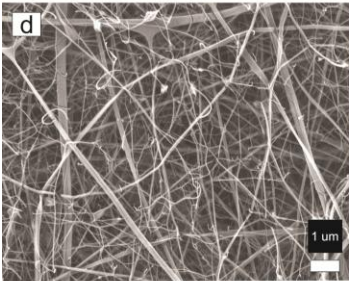
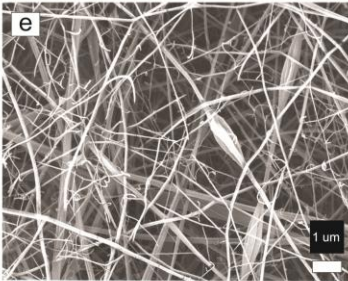
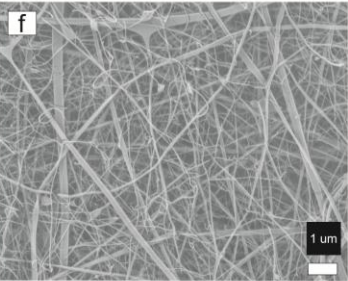
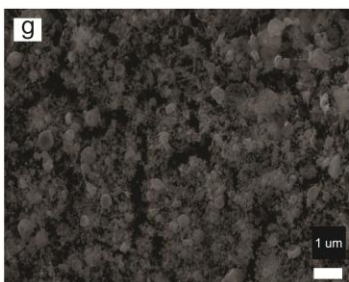
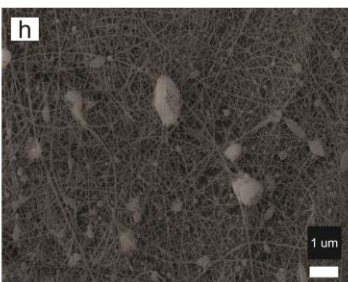
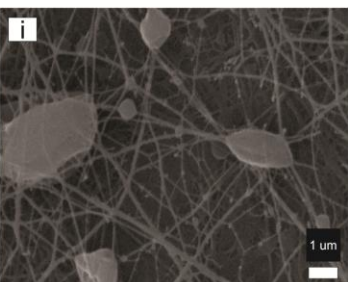
		Voltaje aplicado (KV)		
		18	20	22
Flujo de inyección (mL/h)	0,3			
	0,5			
	0,6			
		9	12	15
		Distancia del capilar al colector (cm)		

Figura 10: Variación de parámetros para obtener un andamio en relación en peso QS/FGS (1:1)

4.2.1.2.3 Parámetros de electrohilado para el andamio en relación en peso QS/FGS (3:1)

Para encontrar los parámetros óptimos de electrohilado para el andamio de QS/FGS en relación en peso 1:3, se varían las condiciones del proceso y se observa que hay formación de fibras en todos parámetros, pero hay presencia de defectos como clúster y aplastamiento en la figura 11 (a, b, c, d, f, g, e i), por lo tanto no se generó evaporación adecuada del solvente. Se genera un andamio homogéneo, cuando el flujo de inyección es de 0,3 ml/h, voltaje 20 KV y la distancia entre el capilar y el inyector es de 15 cm.

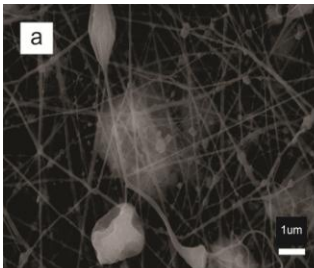
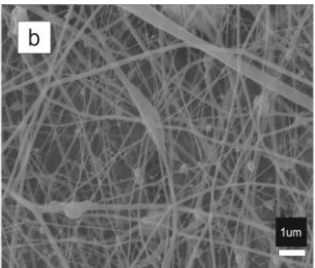
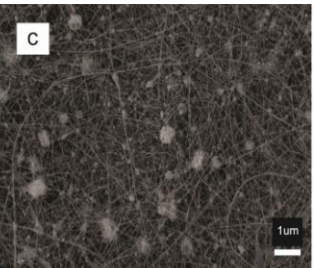
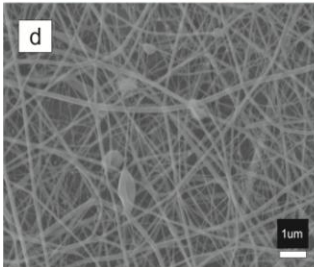
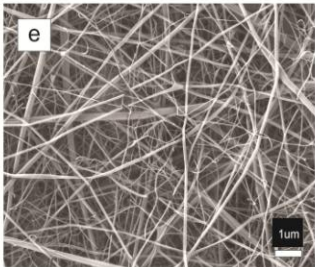
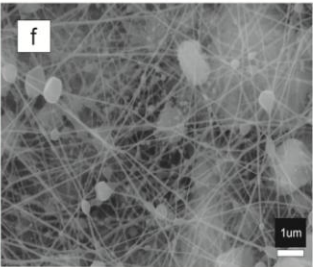
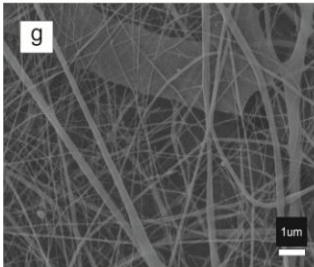
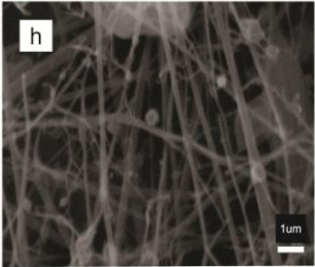
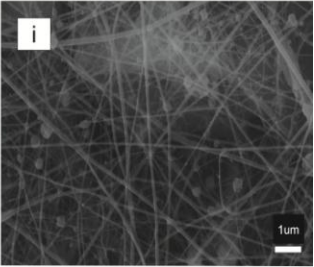
		Voltaje aplicado (KV)		
		18	20	22
Flujo de inyección (mL/h)	0,3			
	0,5			
	0,6			
		9	12	15
		Distancia del capilar al colector (cm)		

Figura 11: Variación de parámetros para obtener un andamio en relación en peso QS/FGS (1:3).

4.2.2.1.1 Efecto de las relaciones en peso QS/FGS

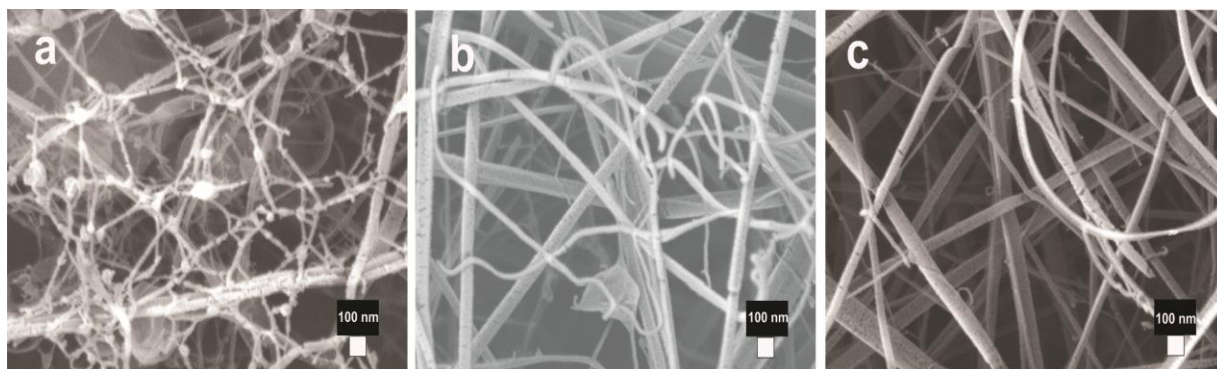


Figura 12: Micrografías por SEM de andamios QS/FGS a 50000X de nanofibras en relación en peso (a) QS/FGS (3:1), (b) QS/FGS (1:1) y (c) QS/FGS (1:3).

En la figura 12, se muestran las micrografías de SEM en aumento de 50000 X de los andamios de QS/FGS, después de variar las condiciones del proceso se escogieron los tres mejores andamios, basados en las micrografías anteriores, donde los parámetros fueron flujo de inyección de 0,5 ml/h, voltaje de 20 kV, distancia del capilar al colector de 12 cm, temperatura de 25°C y humedad relativa de 28% con variaciones en las relaciones en peso QS/FGS de (3:1), (1:1) y (1:3). En la tabla 6 se muestran los resultados de la medición de diámetros y porosidad evaluados con el programa "Image J".

Tabla 5: Determinación del diámetro y porosidad del andamio QS/FGS a diferente relación en peso

Muestra	Relación en peso QS/FGS	Diámetro promedio (nm)	Porosidad promedio (%)
Andamio QS/FGS	(3:1)	104 +/- 14	8,0
	(1:1)	177 +/- 18	25,0
	(1:3)	155 +/- 8	14,0

En la figura 13, se puede observar que a mayor contenido de quitosano respecto a fibroína del gusano de seda, se obtuvo un diámetro más pequeño con variabilidad del 14%, mientras que cuando hay una alta proporción en alguno de los componentes del andamio de QS/FGS, existe una disminución del diámetro. Respecto a la relación en peso de (1:1) y (3:1) se observa una disminución en el diámetro de aproximadamente 41,2 %, mientras que a relación de (1:3) disminuyó el 12,4% en relación con (1:1).

Respecto a la porosidad se encontró algo similar, a relaciones donde uno de los componentes esta en mayor proporción, la porosidad disminuye. Respecto a la relación (1:1), la relación (3:1) presentó una disminución de diámetro de 68%, mientras que a relación (1:3) presento una disminución de 44%, mostrando nuevamente la incidencia de la proporción de uno de los polímeros en la porosidad y en la disminución de diámetro.

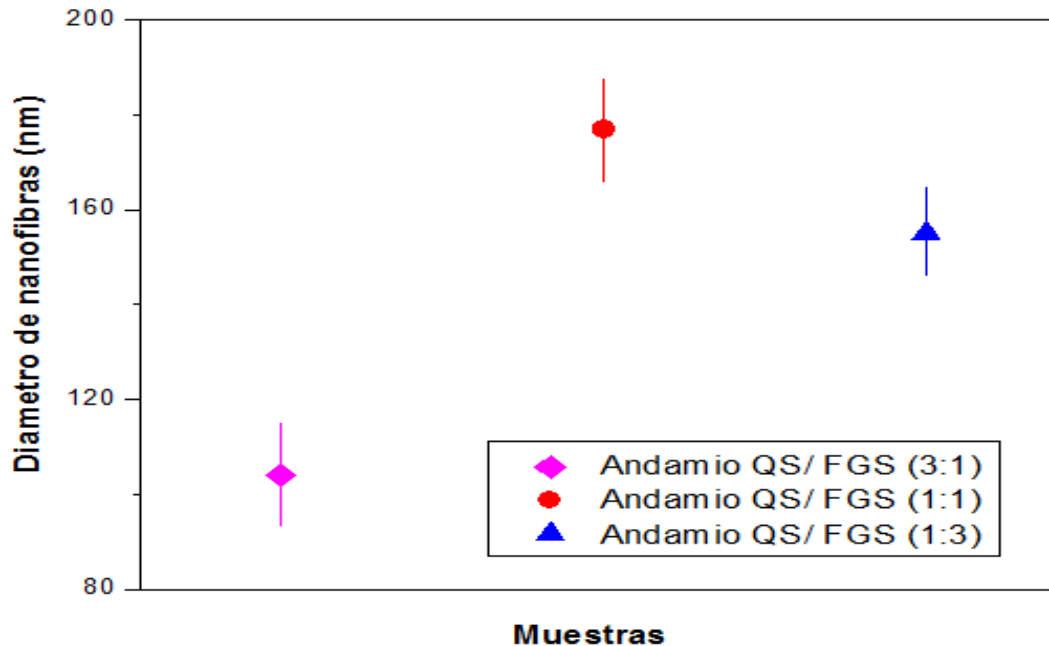
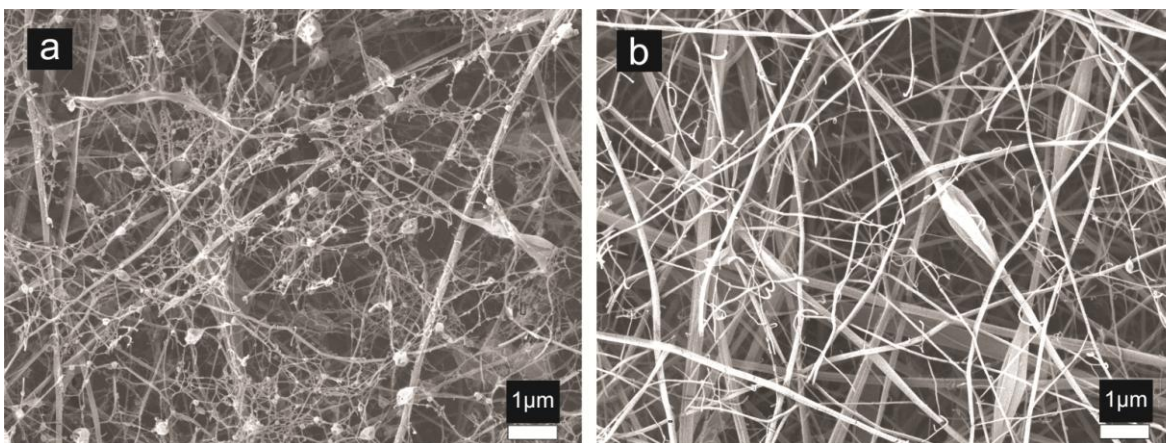


Figura 13: Efecto del diámetro en las nanofibras del andamio QS/ FGS a diferentes relaciones en peso (3:1), (1:1) y (1:3).

Sin embargo a todas las relaciones en peso, los diámetros fueron inferiores a 200 nm, los cuales son valores muy pequeños e inferiores a los reportados por He J, *et al* y por Chen J.P *et. al* donde obtienen fibras con diámetros de 542 a 312 nm y 215 a 478 nm, respectivamente [7, 52]. lo cual es un aporte significativo de esta investigación, ya que encontrar diámetros más pequeños va a facilitar la adherencia celular como lo reporta Park, W.H; *et, al* [8], así como un mejoramiento de las propiedades mecánicas.



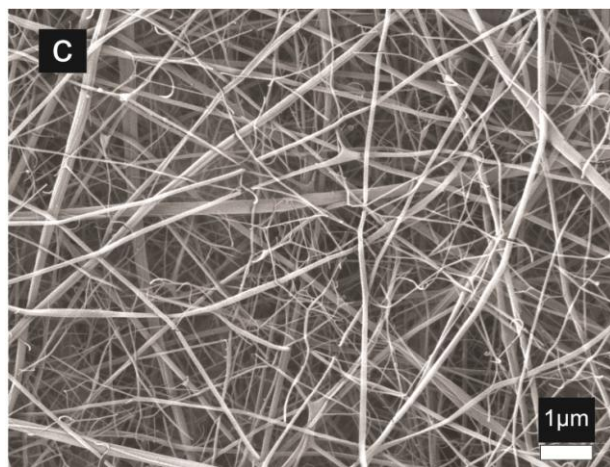


Figura 14: Micrografías por SEM de andamios QS/FGS a 10000X de nanofibras en relación en peso (a) QS/FGS (3:1), (b) QS/FGS (1:1) y (c) QS/FGS (1:3).

Respecto a la morfología, en la figura 14 (a) se presenta el andamio QS/FGS relación (3:1), en la micrografía se pueden observar fibras en forma continuas orientadas al azar, se evidencia la presencia de clústers y aplastamiento de nanofibras, así como la superficie no es homogénea y rugosa. En la figura 14 (b) se puede observar fibras del andamio en relación (1:1) en forma cilíndricas aplastadas orientadas al azar, estas presentan rupturas y se encuentran desordenadas. En la figura 14 (c) se muestra el andamio en relación (1: 3) observando que las fibras están orientadas al azar, son mas homogéneas entre ellas y su superficie es más terso. Por lo tanto, este ultimo andamio es homogéneo, por lo cual es escogido para analizarlo por las diferentes técnicas de caracterización y así determinar si sus características son idóneas para aplicaciones biomédicas .

En la tabla 5, también se presenta la estimación del porcentaje de porosidad calculada por el programa Image J, de los andamios QS / FGS de la figura 14 en relación en peso (3:1), (1:1) y (1:3) los cuales poseen una porosidad promedia de (8%), (25%) y (14%) respectivamente .

4.4.2 Grupos funcionales mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

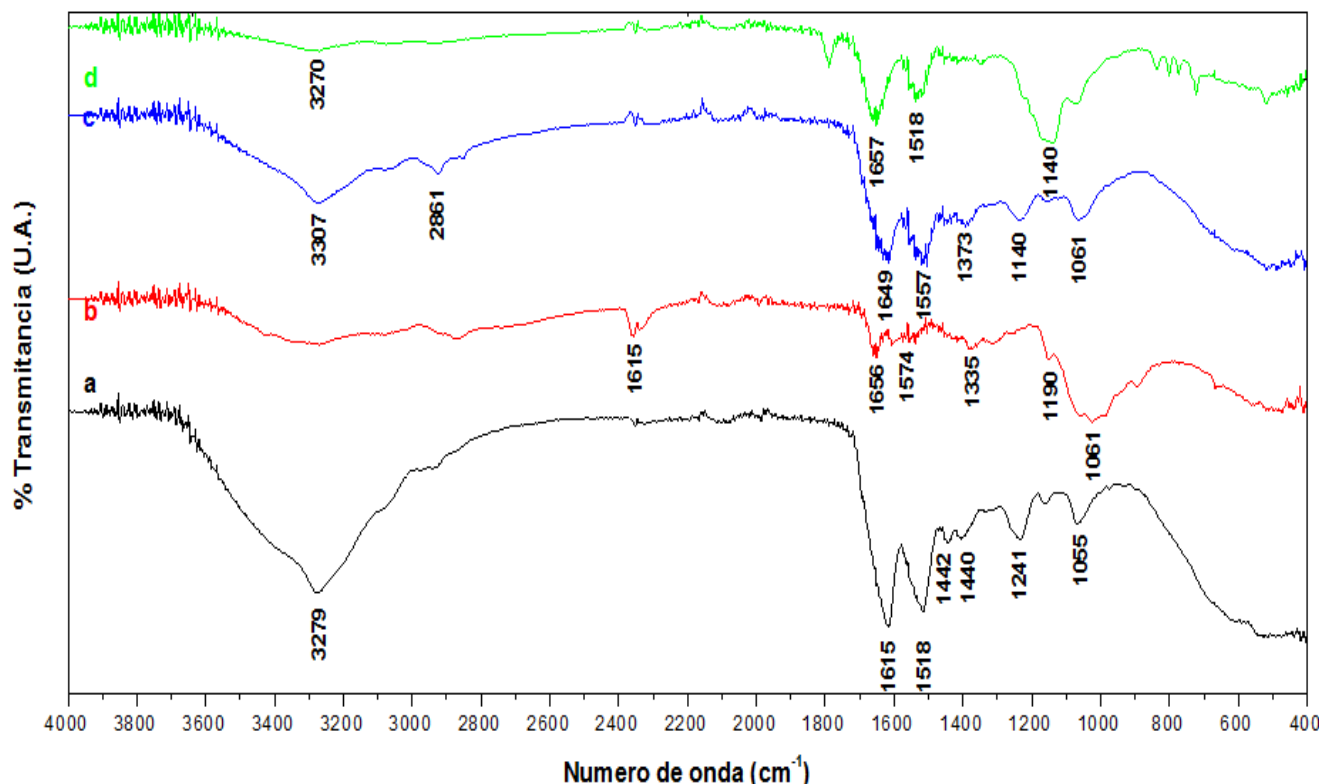


Figura 15: Comparación entre los espectros de infrarrojo del capullo del gusano de seda (a), fibroína (b), quitosano (c) y andamio de QS/FGS (d).

Para el espectro del capullo del gusano de seda figura 15 (a) se observa la banda ubicada a 3279 cm^{-1} dicha banda puede asociarse a modos de estiramiento vibracional de grupos OH con enlaces de hidrógeno presentes en los residuos hidrofílicos correspondientes a la cadena lateral de sericina. La pequeña banda a 2930 cm^{-1} , está asociada a un modo de estiramiento asimétrico de C-H. La banda a 1615 cm^{-1} puede estar relacionada a un modo de estiramiento vibracional del grupo C=O de formación en paralelo de la β -hoja de conformación de la fibroína. La banda localizada a 1518 cm^{-1} posiblemente está asociada a un modo de flexión simétrica de N-H y un modo de estiramiento vibracional de C-N de la amida secundaria. La pequeña banda a 1442 cm^{-1} y 1400 cm^{-1} se atribuye a grupos OH de sericina y treonina de las cadenas laterales. Una banda ubicada a 1235 cm^{-1} corresponde al grupo amino terciario [53].

La asignación de bandas para la fibroína figura 15 (b), se encuentra una banda a ubicada a 1656 cm^{-1} , puede asociarse a un modo de estiramiento vibracional de C=O de formación en paralelo de la β -hoja de conformación. Por otro lado, la señal ubicada a 1574 cm^{-1} , corresponde a un modo de flexión simétrica de N-H y un modo de estiramiento vibracional de C-N de una amida secundaria. La banda relacionada con la presencia de grupo amino terciario, aparece a 1190 cm^{-1} , justo con una señal debida a un modo de flexión simétrica N-H, un modo de estiramiento C=O y modos de estiramiento del enlace

peptídico de formación de espiral al azar. La señal correspondiente a la banda a 1335 cm^{-1} , corresponde con el modo de flexión simétrica del CH_3 . lo descrito anteriormente concuerda con los estudios reportados por Koperska, M.A. *et al* y Chen, F. *et al*. donde se identificaron los principales grupos funcionales para la proteína [54, 55].

Los resultados obtenidos indican que la sericina se encuentra en una conformación de espiral al azar, mientras que la fibroína tiene una forma altamente cristalizado es decir, β - hoja de conformación, Por lo tanto, se evidencia la reducción de sericina con el tratamiento térmico desgomado, presentando la ausencia de las bandas características en 3279 cm^{-1} , 1442 cm^{-1} y 1241 cm^{-1} en la figura 14 b.

La asignación de bandas por grupo funcional para el quitosano (tabla 6) (figura 15 c). La banda ancha a 3307 cm^{-1} , corresponde a un modo de vibración de tensión de OH que se superponen por estiramiento de N-H. La señal correspondiente con la banda a 2861 cm^{-1} , se encuentra en una región espectral compleja y se atribuye a un estiramiento simétrico y antisimétrico del anillo C-H y entre grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$ y $-\text{CH}_3$. Por otro lado, la señal ubicada a 1649 cm^{-1} , corresponde a un modo vibracional de C=O y N-H de la amida primaria. La banda a 1557 cm^{-1} , puede relacionarse con la amida secundaria pertenecientes a modos vibracionales de C=O y N-H. La pequeña banda a 1373 cm^{-1} , posiblemente está asociada a un modo de flexión de CH_2 . La banda de absorción a 1140 cm^{-1} , justo con una señal debida al estiramiento y deformación asimétrica del puente C-O-C. Las señales con la banda ubicada a 1061 cm^{-1} corresponden a vibraciones esqueléticas de estiramiento de C-O características del sacárido del quitosano [56-58].

Tabla 6: Posición de las bandas de absorción infrarrojas de quitosano.

Banda	Número de onda (cm^{-1})	Enlace	Tipo de vibración
1	892	$\text{CH}(\delta)$, enlace glucosídico β	Flexión
2	1012	Esqueleto C-O (ν)	Tensión
3	1069	Esqueleto C-O (ν)	Tensión
4	1140	C-O-C(ν_{as})	Tensión (simétrica, antisimétrica)
5	1310	C-N (ν), NH(δ)	Tensión, Flexión
6	1373	$\text{CH}_2(\delta)$	Flexión
7	1557	NH(δ), C-N(ν), C-C(ν).	Tensión
8	1649	C=O(ν), NH(ν)	Tensión
9	2861	$\text{CH}_2(\nu_{as}, \nu_s)$	Tensión (simétrica, antisimétrica)
10	3307	NH(ν), OH(ν)	Tensión

Al comparar el espectro infrarrojo del andamio de nanofibras QS/FGS (figura 15 d), con los polímeros correspondientes de fibroína y quitosano, se puede observar que la mayoría de las señales coinciden, indicando que se presenta en el andamio los grupos funcionales mas importantes como son amida I, amida II, amida III y grupos C=O de los polímeros, lo que evidencia que no existe un cambio de los grupos funcionales, por tanto, la velocidad de flujo, voltaje aplicado y distancia del capilar al colector son óptimos para la evaporación del ácido trifluoroacético al no obtener señales de interferencia en la formación de nanofibras. Sin embargo la banda observada en 3270 cm^{-1} presenta una intensidad menor, lo que puede deberse a cambios en la morfología de las nanofibras.

4.4.3 Cristalinidad por difracción de rayos X (XRD).

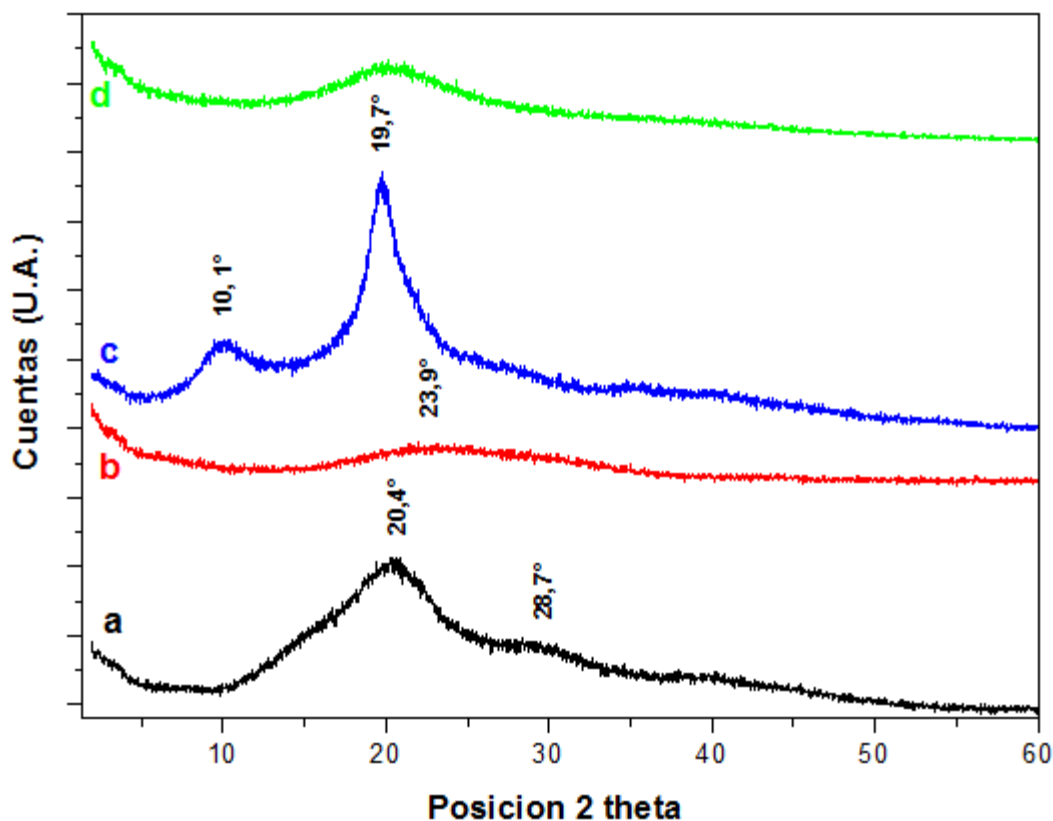


Figura 16: Patrones de difracción de rayos X de capullo del gusano de seda (a), fibroína (b), quitosano (c) y andamio QS/FGS (d).

El análisis mediante difracción de rayos X (XRD), indica que las muestras en la figura 16, tienen un nivel de organización dependiente de la naturaleza de las muestras. Los difractogramas de los polímeros de fibroína y quitosano son usados como referencia para poder determinar si hay cristalinidad en el andamio QS/FGS.

En la figura 16 a, se muestra el difractograma de rayos X del capullo de gusano de seda (*Bombyx mori*), en el cual evidencian dos señales de difracción a $20,4^\circ$ (ángulo de Bragg), atribuidas a la estructura cristalina de la conformación β -hoja y conformación al azar de seda [59]. En la figura 16 (b) se observa una señal de difracción correspondiente

a la fibroína en 23,9°, la cual indica amorficidad en la estructura β -hoja indicando no hay cristalinidad. Realizando una comparación entre los difractogramas se observa que la señal de fibroína no presenta intensidad, llegando a la conclusión que la cristalinidad la genera la conformación al azar de la sericina. Por lo tanto, la parte no cristalina de fibroína le contribuye flexibilidad y elasticidad.

En la figura 16 c se observa el difractograma de quitosano en el cual se evidencian tres señales de difracción en 10,1° y 19,7°, los cuales son característicos de la estructura cristalina hidratada de quitosano [52].

Tabla 7: Resultado de la indexación del capullo de gusano de seda, fibroína, quitosano.

MUESTRAS	DISTANCIA INTERPLANAR (Å)	ÁNGULO DE BRAGG (2 θ)	INTENSIDAD (CONTADOR)	INTENSIDAD RELATIVA %
Capullo de gusano de seda	4,351	20,393	1225	100
	3,100	28,775	638	52,1
Fibroína	3,709	23,969	338	100
	3,068	29,081	289	85,6
Quitosano	8,790	10,054	767	39,7
	4,490	19,729	1931	100
	2,560	35,047	448	23,2

De acuerdo a las condiciones en que se realiza el ensayo de DRX, se encontró que el difractograma del andamio QS/FGS (figura 16 d) no presenta una estructura cristalina, debido a la ausencia de señales definidas. Las nanofibras poliméricas obtenidas mediante el proceso de electrohilado no permiten la formación de fases cristalinas del tamaño adecuado para ser detectados por esta técnica. Sin embargo, Gómez-Pachón, E. Y; *et al* [2] sugiere la técnica de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS), para obtener información acerca de la forma y tamaño del cristal de los andamios, debido a que tiene la capacidad de medir a ángulos bajos 0,1 a 10° entregando información estructural de macromoléculas que están en el orden de entre 5 y 25 nm. Por lo tanto se debe observar la cristalinidad mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

4.4.4 Temperatura de cambio de masa por análisis termogravimétrico (TGA).

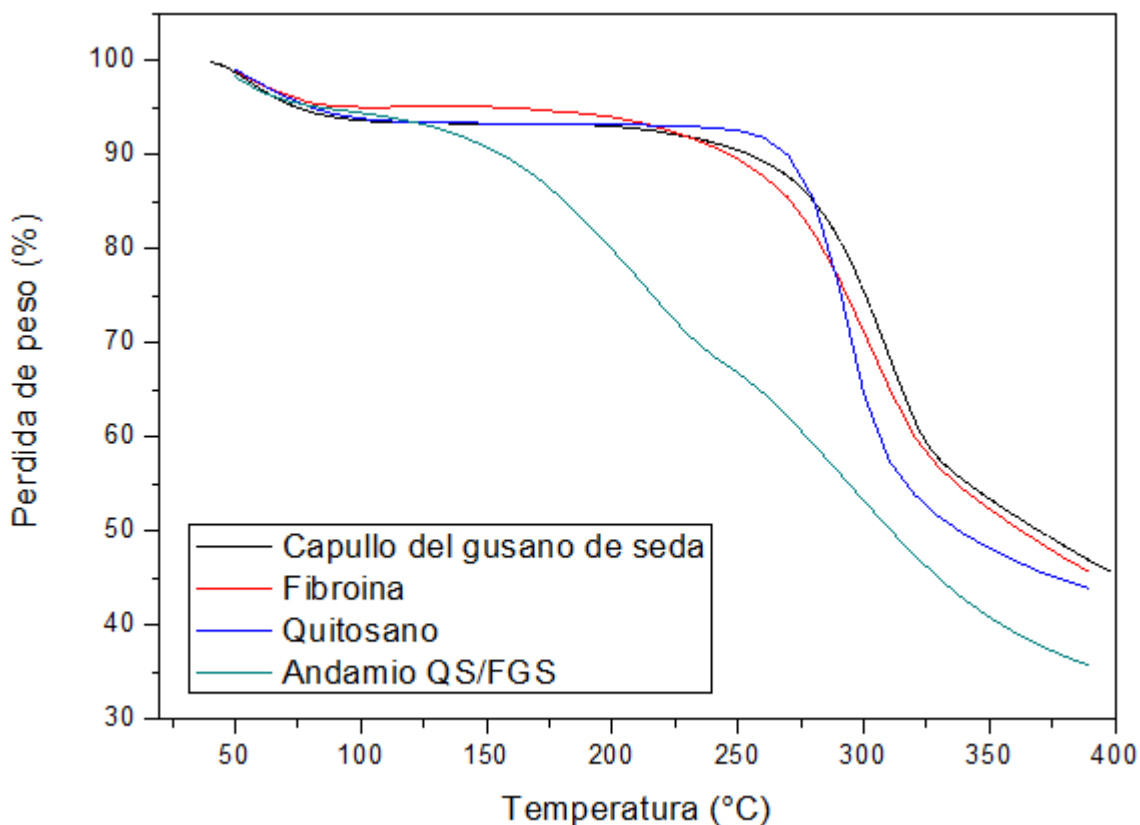


Figura 17: TGA de Capullo del gusano de seda (a), fibroína (b), quitosano (c) y andamio QS/FGS(d).

En la figura 17 se presentan los termogramas para cada una de las muestras de capullos de gusano de seda (a), fibroína (b), quitosano (c) y andamio QS/FGS (d), realizado entre 50 y 380 °C, permitió determinar la degradación y estabilidad térmica de cada una de las muestras. Con el fin de reconocer el comportamiento térmico de descomposición en detalle, se obtuvieron análisis termogravimétricos diferenciales (DTG) mediante el programa TA Universal Analysis arrojando los resultados observados en la tabla 8 en el cual se presenta la pérdida de peso y la temperatura de descomposición por regiones de cada muestra.

Tabla 8: Pérdida de peso y temperatura de capullos de gusano de seda, fibroína, quitosano y andamio QS/FGS.

Muestra	Región	Pérdida de peso (%)	Temperatura (°C)
Capullo del gusano de seda	Región I	6,25	57
	Región II	47,22	310
Fibroína	Región I	4,78	54
	Región II	49,38	300
Quitosano	Región I	6,46	58
	Región II	50,22	294
Andamio QS/FGS	Región I	6,01	52
	Región II	26,23	213
	Región II	32,79	300

Para la evaluación de la estabilidad térmica del capullo del gusano de seda son evidentes dos etapas de pérdida de peso mostradas en la tabla 8. La primera pérdida de peso de 6,25 % aparece a 57°C, atribuida a la evaporación de agua retenida por adsorción física. La segunda a 310° C se debe a la pérdida de peso de 47,22 % asignado a la descomposición térmica del capullo del gusano de seda (*Bombyx mori*) en la especie de fibroína, la cual tiene una estructura β -hoja orientada [60].

En el termograma de fibroína (figura 16 b) se puede observar dos regiones, la primera se debe a la pérdida de peso de 4,78 % atribuida a la evaporación de agua retenida por adsorción física a 54 °C. La segunda se debe a la pérdida de peso de 49,38 % relacionada a la descomposición de la fibroína asociada a la pérdida de la estructura β -hoja orientada a 300 °C [61].

En la figura 16 c, se muestran los resultados de TGA para el quitosano donde se observan dos pérdidas de peso. El primer evento térmico se produce a 58 °C con una pérdida de peso de 6,46 % asignado a la pérdida de agua adsorbida físicamente. El segundo evento térmico se observa a 294 °C con una pérdida de peso de 50,22%, relacionada a la descomposición de la muestra a través de la despolimerización de la cadena del quitosano [62].

Para la evaluación de la estabilidad térmica del andamio QS/FGS, el proceso de degradación se dividió en tres etapas. La primera pérdida de peso de 6,01% está asociado con la pérdida de agua el cual aparece a 52 °C, la segunda temperatura de descomposición apareció a 212 °C se atribuye a la fibroína, la cual presenta una pérdida de peso de 26,23%. relacionada a la característica hidrofílica de la proteína. Por otro lado, el quitosano presenta una descomposición térmica a 300 °C con una pérdida de peso de 32,79%, que se atribuye a la deshidratación de los anillos sacáridos, la despolimerización y la descomposición de las unidades acetiladas y desacetiladas del polímero [63, 64].

Al realizar una comparación entre las temperaturas de descomposición de fibroína, quitosano con el andamio de QS/FGS se observa que las temperaturas de descomposición se relacionan, indicando la formación de interacciones intermoleculares entre las muestras. En consecuencia, los análisis permitieron localizar la temperatura ideal del tratamiento térmico, las cuales favorecieron la obtención de nanofibras, sino que además evitó la volatilización de quitosano y fibroína.

4.4.5 Temperatura de transición por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

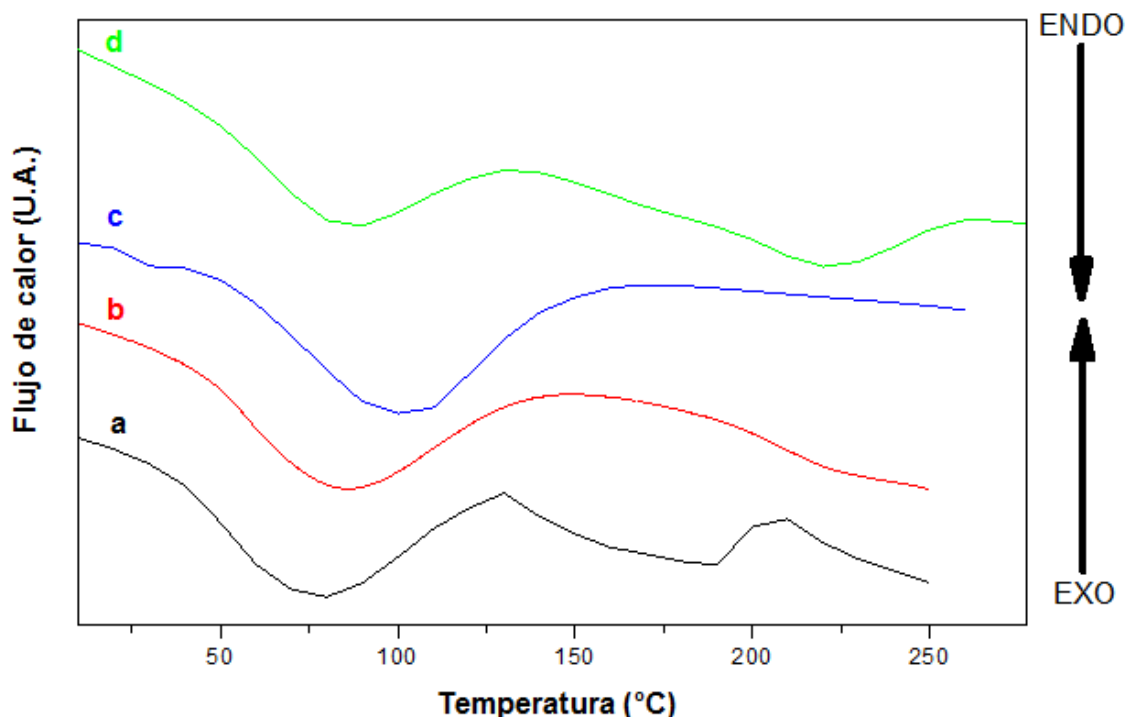


Figura 18: DSC de Capullo del gusano de seda (a), fibroína (b), quitosano (c) y andamio QS/FGS(d).

Las transiciones térmicas de capullo del gusano de seda (a), fibroína (b), quitosano (c) y andamio de QS/FGS (d) son mostradas en la figura 18. Estos termogramas permitieron determinar las temperaturas de transición vítrea (T_g), temperatura de cristalización (T_c) y temperatura de fusión (T_f) de cada una de las muestras descritas en la tabla 9. Con el fin de reconocer el comportamiento en detalle se obtuvieron los análisis mediante el programa TA Universal Analysis.

Tabla 9: Datos de T_g , T_c y T_f obtenidas de los termogramas de DSC para las muestras de capullo de gusano de seda, fibroína, quitosano y andamio QS/FGS.

Muestra	T_g (°C)	T_c (°C)	T_f (°C)
Capullo del gusano de seda	160	142	192
Fibroína	176	218	No presenta

Quitosano	No presenta	168	No presenta
Andamio QS/FGS	170	137	222

T_g : temperatura de transición vítrea. T_c : temperatura de cristalización T_f : temperatura de fusión.

En la figura 18 (a), se puede observar la curva del capullo del gusano de seda muestra un pico exotérmico entre 142 °C, correspondiente a la cristalización del polímero. La temperatura de fusión esta en 192 °C con una entalpia de 19,2 J/g [60].

En el termograma de fibroína en la figura 18 (b), se puede observar una relajación entálpica (pico endotérmico) a 56°C asignado a la evaporación de agua por adsorción física, esta transición concuerda con lo observado en el comportamiento de TGA, se puede observar una transición vítrea A 176 °C, donde las regiones amorfas aumentan brevemente antes del evento de cristalización a 218°C donde ocurre una relajación estructural que permite una reorganización de la beta hoja [61].

En la figura 18 (c), corresponde al DSC de la muestra de quitosano, la cual mostró la presencia de dos eventos térmicos. El primer evento es una relajación entálpica (pico endotérmico) a 100°C, atribuida a la pérdida de agua por evaporación. El segundo evento térmico está relacionado con un pico exotérmico a 168 °C, correspondiente a la cristalización del polímero [65].

Para el andamio QS/FGS figura 18 (d), las nanofibras mostraron un pico de cristalización (pico exotérmico) encontrado a 137 °C. Se observan dos picos de relajación entálpica (pico endotérmico), el primer evento se observa a 85 °C atribuido a una evaporación de agua de la muestra, el segundo evento térmico se observa 221 °C con una entalpia 44,16 J/g correspondiente a la temperatura de fusión. Se observa que en la primera transición las entalpias de quitosano y fibroína se traslapan y la segunda transición corresponde a la fibroína.

4.4.8 Determinación de la citocompatibilidad *in vitro* de los andamios QS/FGS.

Los andamios que contienen quitosano y fibroína de seda son solubles en agua. Se observa que una gota de agua o solución básica, pueden destruir la estructura de nanofibras, Por lo tanto, es necesario el uso de glutaraldehído generando un entrecruzamiento al unir los grupos aldehído con los grupos amino libres de quitosano y de aminoácidos de fibroína de seda. Después del entrecruzamiento con GTA el andamio tomó un color amarillo y se encogió ligeramente, este cambio se debe a la creación del enlace CH=O vinculados entre los grupos amino libres de QS, FGS y GTA. Una vez realizado el entrecruzamiento del andamio de QS/ FGS, se determina el pH de los andamios encontrando que aproximadamente es de 5, incompatible con la viabilidad celular. Por tanto se somete a liofilización el andamio encontrando que es posible aumentar el pH a 6.

Se observó la citocompatibilidad del andamio QS/FGS, mediante un ensayo de viabilidad celular de fluorescencia de dos colores con esto se busca la formación simultanea de

células vivas y muertas, para determinar parámetros de viabilidad celular, intracelular actividad esterasa e integridad del andamio. En la figura 19, se realiza una comparación observando que las células en la figura 19 (b) mantiene su integridad permitiendo que la calceína polianiónica se conserve dentro de las células vivas produciendo un color uniforme de fluorescencia verde indicando que las células están vivas. Por otro lado, se observa en la figura 19 (a), que el homodímero de etidio reacciona en las células dañadas del andamio QS/FGS y tras la unión de ácidos se produce una fluorescencia de color rojo indicando que las células están muertas. Debido a que el pH debe encontrarse en 7,4 en el cual se encuentran los fluidos corporales o fisiológicos.

Por otra parte durante el cultivo celular se observó que los andamios son estables y no presentan rupturas a los dos días de cultivo, por lo tanto se genera entre la fibroína y quitosano un entrecruzamiento con el glutaraldehído adecuado ya que este no permite la realización del ensayo de viabilidad.

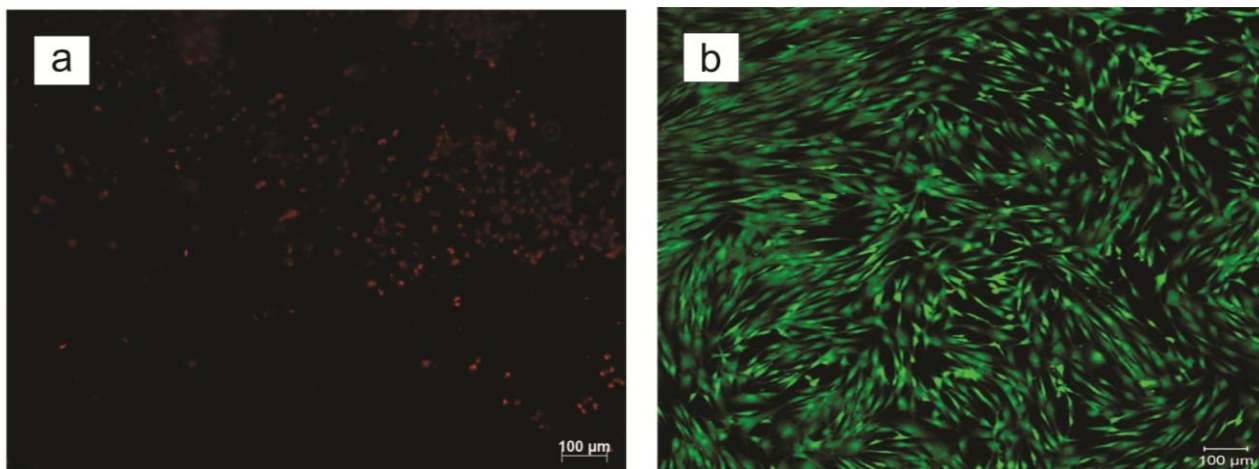


Figura 19: Ensayo de viabilidad celular de fluorescencia de dos colores tomadas a dos días de cultivo celular, andamio QS/FGS (a) y control positivo de la formación celular (b)

4.4.9 Posibles aplicaciones en biomedicina del andamio QS/FGS.

El andamio de QS/FGS obtenido presenta un tamaño de diámetro entre 155 ± 8 nm con una porosidad de 14 %, por el tamaño encontrado estas nanofibras se pueden promover para el desarrollo y maduración de neuronas donde se necesita un diámetro entre 400 ± 76 nm. Esta mezcla polímeros también puede ser empleada para el vendaje de heridas en la ingeniería de tejidos donde el diámetro requerido se encuentra entre 30 a 129 nm [40] .

CONCLUSIONES

1. A partir del tratamiento de desgomado se concluyó que al realizar un tratamiento termoquímico llevando a temperaturas mayores de 60°C, se puede obtener una completa separación de fibroína de capullo del gusano de seda (*Bombyx mori*), esta separación evidenció un correcto desgomado en las observaciones de microscopia electrónica de barrido (SEM), mostrando diámetros promedio para las fibras del capullo del gusano de seda de 36 +/- 22 μm y para la fibroína de 13 +/- 7 μm , También se confirmó por la prueba de caracterización por espectroscopia infrarroja con trasformada de Fourier (FTIR) la ausencia de bandas características en 3279 cm^{-1} , 1373 cm^{-1} y 1241 cm^{-1} correspondientes a la sericina.
2. A partir del estudio experimental se concluyó que tanto la velocidad de colección en el proceso del electrohilado, el voltaje aplicado, la distancia del capilar al colector y la relación en peso del andamio QS/FGS tienen una fuerte influencia en las propiedades morfológicas de los andamios celulares, y por tanto se determinó los parámetros óptimos de electrohilado, los cuales son: flujo de inyección de 0,5 mL/h, voltaje aplicado de 20 kV y distancia del capilar al colector de 12 cm, en relación en peso (3:1) (1:1) y (3:1) del andamio QS/FGS.
3. Se determinó que a mayor contenido de quitosano respectó a la fibroína, se encuentra andamios con defectos como clúster, rupturas y aglomeraciones de nanofibras obteniendo gran variabilidad de diámetro cuando hay una alta proporción de los componentes.
4. Un aspecto importante fue la determinación experimental de la relación en peso para los andamios de QS/FGS. La cual fue (1:3) este andamio presenta fibras orientadas al azar, homogéneas y no presentan defectos, por lo tanto, este andamio facilita la adhesión celular ya que se encuentra fibras con diámetro entre los 155 nm con una porosidad de 14 %.
5. El análisis de espectroscopía infrarroja confirmó que el andamio de QS/FGS presenta los grupos funcionales como amina primaria, amina secundaria, amina terciaria y grupos C=O de los polímeros, por lo tanto no existe un cambio de grupos funcionales indicando que los parámetros encontrados fueron los óptimos para obtener andamios celulares de QS/FGS al no obtener señales de interferencia del ácido trifluoroacético en las muestras finales.
6. Se logró determinar que a pesar de que el análisis de difracción de rayos X, no permite demostrar la formación de una estructura cristalina en el andamio de QS/FGS, los resultados de calorimetría diferencial de barrido muestran la presencia de cristales, por las transiciones de cristalización. Lo cual puede mostrar que las propiedades estructurales de las nanofibras lograron ser mejoradas para la obtención mediante electrohilado.

7. El análisis termogravimétrico permite evaluar la estabilidad térmica y las temperaturas de descomposición de los polímeros de fibroína y quitosano y del andamio QS/FGS, estas se relacionan indicando la formación de interacciones intermoleculares entre las muestras.
8. La aplicación de la prueba de citocompatibilidad in vitro mediante el ensayo de viabilidad celular, nos permitió observar que el andamio QS/FGS en relación (1:3) es estable y no presenta rupturas y aunque no se ha logrado una prueba definitiva para el crecimiento celular este presenta una buena adherencia.

RECOMENDACIONES

Se recomienda variar la concentración de la solución polimérica de quitosano y fibroína del gusano de seda, así como lograrla combinar con otros disolventes con el objetivo de obtener nanofibras de un tamaño igual al obtenido con este trabajo, con lo que se conseguiría mejorar las propiedades estructurales y de adherencia celular.

Para determinar la cristalinidad del andamio se recomienda utilizar la técnica de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS), para obtener información acerca de la forma y tamaño de cristales y así tener una prueba definitiva que confirme los resultados de calorimetría diferencial de barrido-DSC.

La finalidad del andamio QS/FGS, obtenido en este trabajo es considerarlo en futuras investigaciones para posibles aplicaciones en la ingeniería de tejidos. Por lo tanto, se recomienda utilizar otros agentes de entrecruzamiento o método para el aumento de pH, para poder llegar a condiciones fisiológicas (37°C y pH=7,4), este estudio debe complementarse con pruebas de crecimiento celular *in vitro* e *in vivo* para las aplicaciones de las nanofibras obtenidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] X. Zhang, M. R. Reagan, and D. L. Kaplan, "Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, pp. 988-1006, 2009.
- [2] E. Y. Gómez-Pachón, F. M. Sánchez-Arévalo, F. J. Sabina, A. Maciel-Cerda, R. M. Campos, N. Batina, *et al.*, "Characterisation and modelling of the elastic properties of poly (lactic acid) nanofibre scaffolds," *Journal of Materials Science*, vol. 48, pp. 8308-8319, 2013.
- [3] L. S. Nair and C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *Progress in Polymer Science*, vol. 32, pp. 762-798, 2007.
- [4] L. W. Dunne, T. Iyyanki, J. Hubenak, and A. B. Mathur, "Characterization of dielectrophoresis-aligned nanofibrous silk fibroin–chitosan scaffold and its interactions with endothelial cells for tissue engineering applications," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, pp. 3630-3640, 2014.
- [5] B. Duan, X. Yuan, Y. Zhu, Y. Zhang, X. Li, Y. Zhang, *et al.*, "A nanofibrous composite membrane of PLGA–chitosan/PVA prepared by electrospinning," *European Polymer Journal*, vol. 42, pp. 2013-2022, 2006.
- [6] Q. Zhang, M. Li, W. Xu, J. Li, and S. Yan, "A novel silk fibroin scaffolds with oriented multichannels," *Materials Letters*, vol. 105, pp. 8-11, 2013.
- [7] J.-P. Chen, S.-H. Chen, and G.-J. Lai, "Preparation and characterization of biomimetic silk fibroin/chitosan composite nanofibers by electrospinning for osteoblasts culture," *Nanoscale research letters*, vol. 7, pp. 1-11, 2012.
- [8] W. H. Park, L. Jeong, D. I. Yoo, and S. Hudson, "Effect of chitosan on morphology and conformation of electrospun silk fibroin nanofibers," *Polymer*, vol. 45, pp. 7151-7157, 9/29/ 2004.
- [9] H.-W. Tong, X. Zhang, and M. Wang, "A new nanofiber fabrication technique based on coaxial electrospinning," *Materials Letters*, vol. 66, pp. 257-260, 2012.
- [10] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnology advances*, vol. 28, pp. 325-347, 2010.
- [11] Z.-M. Huang, Y.-Z. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites," *Composites science and technology*, vol. 63, pp. 2223-2253, 2003.
- [12] T. J. Sill and H. A. von Recum, "Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 1989-2006, 2008.
- [13] S. Megelski, J. S. Stephens, D. B. Chase, and J. F. Rabolt, "Micro-and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers," *Macromolecules*, vol. 35, pp. 8456-8466, 2002.
- [14] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W.-E. Teo, T.-C. Lim, and Z. Ma, *An introduction to electrospinning and nanofibers* vol. 90: World Scientific, 2005.
- [15] M. M. Demir, I. Yilgor, E. Yilgor, and B. Erman, "Electrospinning of polyurethane fibers," *Polymer*, vol. 43, pp. 3303-3309, 2002.
- [16] X. Yuan, Y. Zhang, C. Dong, and J. Sheng, "Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning," *Polymer International*, vol. 53, pp. 1704-1710, 2004.
- [17] D. Li, Y. Wang, and Y. Xia, "Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays," *Nano letters*, vol. 3, pp. 1167-1171, 2003.
- [18] C. L. Casper, J. S. Stephens, N. G. Tassi, D. B. Chase, and J. F. Rabolt, "Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process," *Macromolecules*, vol. 37, pp. 573-578, 2004.

- [19] C. L. Craig, "Evolution of arthropod silks," *Annual review of entomology*, vol. 42, pp. 231-267, 1997.
- [20] F. S. Madsen, "An Analysis of Global Silk Trade," 2012.
- [21] C. Cifuentes Correa and K. Sohn, "Manual técnico de sericultura: cultivo de la morera y cria del gusano de seda en el trópico," 1998.
- [22] T. Gamo, T. Inokuchi, and H. Laufer, "Polypeptides of fibroin and sericin secreted from the different sections of the silk gland in *Bombyx mori*," *Insect Biochemistry*, vol. 7, pp. 285-295, 1977.
- [23] K. Tanaka, S. Inoue, and S. Mizuno, "Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the HL complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*," *Insect biochemistry and molecular biology*, vol. 29, pp. 269-276, 1999.
- [24] G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, *et al.*, "Silk-based biomaterials," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 401-416, 2003.
- [25] C. Vepari and D. L. Kaplan, "Silk as a biomaterial," *Progress in polymer science*, vol. 32, pp. 991-1007, 2007.
- [26] K. Kojima, Y. Kuwana, H. Sezutsu, I. Kobayashi, K. Uchino, T. Tamura, *et al.*, "A new method for the modification of fibroin heavy chain protein in the transgenic silkworm," *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 71, pp. 2943-2951, 2007.
- [27] S. Inoue, K. Tanaka, F. Arisaka, S. Kimura, K. Ohtomo, and S. Mizuno, "Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6: 6: 1 molar ratio," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, pp. 40517-40528, 2000.
- [28] H. Sinohara, "Glycopeptides isolated from sericin of the silkworm, *Bombyx mori*," *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, vol. 63, pp. 87-91, 1979.
- [29] C.-Z. Zhou, F. Confalonieri, N. Medina, Y. Zivanovic, C. Esnault, T. Yang, *et al.*, "Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene," *Nucleic acids research*, vol. 28, pp. 2413-2419, 2000.
- [30] M.-p. Ho, H. Wang, and K.-t. Lau, "Effect of degumming time on silkworm silk fibre for biodegradable polymer composites," *Applied Surface Science*, vol. 258, pp. 3948-3955, 2012.
- [31] P. Bose, S. Majumdar, and K. Sengupta, "Role of the amino acids in silkworm, *Bombyx mori* L. nutrition and their occurrence in haemolymph, silk gland and silk cocoons—A review," *Indian J. Seric*, vol. 28, pp. 17-30, 1989.
- [32] M. Zurovec, C. Yang, D. Kodrík, and F. Sehnal, "Identification of a novel type of silk protein and regulation of its expression," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, pp. 15423-15428, 1998.
- [33] M. Elices, J. P. Rigueiro, G. R. Plaza, and G. V. Guinea, "Usos médicos de la seda," *Investigación y ciencia*, 2011.
- [34] C. Lárez-Velásquez, "Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro," *Avances en Química, Venezuela*, 2006.
- [35] G.-J. Lai, K. T. Shalumon, S.-H. Chen, and J.-P. Chen, "Composite chitosan/silk fibroin nanofibers for modulation of osteogenic differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells," *Carbohydrate Polymers*, vol. 111, pp. 288-297, 2014.
- [36] A. Martins, J. V. Araújo, R. L. Reis, and N. M. Neves, "Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications," 2007.
- [37] R. Lanza, R. Langer, and J. P. Vacanti, *Principles of tissue engineering*: Academic press, 2011.

- [38] S. Kidoaki, I. K. Kwon, and T. Matsuda, "Mesoscopic spatial designs of nano-and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 37-46, 2005.
- [39] H. S. Yoo, T. G. Kim, and T. G. Park, "Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 61, pp. 1033-1042, 2009.
- [40] S. M. Yukseloglu, N. Sokmen, and S. Canoglu, "Biomaterial applications of silk fibroin electrospun nanofibres," *Microelectronic Engineering*, vol. 146, pp. 43-47, 10/1/ 2015.
- [41] S. Dumitriu, *Polymeric biomaterials, revised and expanded*: CRC Press, 2001.
- [42] S. Quraishi, M. Martins, A. A. Barros, P. Gurikov, S. P. Raman, I. Smirnova, *et al.*, "Novel non-cytotoxic alginate–lignin hybrid aerogels as scaffolds for tissue engineering," *The Journal of Supercritical Fluids*.
- [43] F. Mottaghitlab, M. Farokhi, M. A. Shokrgozar, F. Atyabi, and H. Hosseinkhani, "Silk fibroin nanoparticle as a novel drug delivery system," *Journal of Controlled Release*, vol. 206, pp. 161-176, 5/28/ 2015.
- [44] S. Shahverdi, M. Hajimiri, M. A. Esfandiari, B. Larijani, F. Atyabi, A. Rajabiani, *et al.*, "Fabrication and structure analysis of poly(lactide-co-glycolic acid)/silk fibroin hybrid scaffold for wound dressing applications," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 473, pp. 345-355, 10/1/ 2014.
- [45] C. Pillai, W. Paul, and C. P. Sharma, "Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation," *Progress in polymer science*, vol. 34, pp. 641-678, 2009.
- [46] K. T. Shalumon, K. H. Anulekha, C. M. Girish, R. Prasanth, S. V. Nair, and R. Jayakumar, "Single step electrospinning of chitosan/poly(caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture," *Carbohydrate Polymers*, vol. 80, pp. 413-419, 4/12/ 2010.
- [47] P. Jiang, H. Liu, C. Wang, L. Wu, J. Huang, and C. Guo, "Tensile behavior and morphology of differently degummed silkworm (*Bombyx mori*) cocoon silk fibres," *Materials Letters*, vol. 60, pp. 919-925, 4// 2006.
- [48] "Woodhead Publishing Series in Biomaterials," in *Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, S. C. Kundu, Ed., ed: Woodhead Publishing, 2014, pp. xix-xxiii.
- [49] Z.-x. Cai, X.-m. Mo, K.-h. Zhang, L.-p. Fan, A.-l. Yin, C.-l. He, *et al.*, "Fabrication of chitosan/silk fibroin composite nanofibers for wound-dressing applications," *International journal of molecular sciences*, vol. 11, pp. 3529-3539, 2010.
- [50] P. Sangsanoh and P. Supaphol, "Stability improvement of electrospun chitosan nanofibrous membranes in neutral or weak basic aqueous solutions," *Biomacromolecules*, vol. 7, pp. 2710-2714, 2006.
- [51] H.-P. Zhao, X.-Q. Feng, W.-Z. Cui, and F.-Z. Zou, "Mechanical properties of silkworm cocoon pelades," *Engineering Fracture Mechanics*, vol. 74, pp. 1953-1962, 8// 2007.
- [52] J. He, Y. Cheng, P. Li, Y. Zhang, H. Zhang, and S. Cui, "Preparation and characterization of biomimetic tussah silk fibroin/chitosan composite nanofibers," *Iranian Polymer Journal*, vol. 22, pp. 537-547, 2013.
- [53] B. B. Mandal, B. Ghosh, and S. C. Kundu, "Non-mulberry silk sericin/poly (vinyl alcohol) hydrogel matrices for potential biotechnological applications," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 49, pp. 125-133, 8/1/ 2011.
- [54] M. A. Koperska, D. Pawcenis, J. Bagniuk, M. M. Zaitz, M. Missori, T. Łojewski, *et al.*, "Degradation markers of fibroin in silk through infrared spectroscopy," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 105, pp. 185-196, 7// 2014.
- [55] F. Chen, D. Porter, and F. Vollrath, "Silk cocoon (*Bombyx mori*): Multi-layer structure and mechanical properties," *Acta Biomaterialia*, vol. 8, pp. 2620-2627, 7// 2012.

- [56] H. Staroszczyk, K. Sztuka, J. Wolska, A. Wojtasz-Pająk, and I. Kołodziejska, "Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 117, pp. 707-712, 1/3/ 2014.
- [57] K. Van de Velde and P. Kiekens, "Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state ¹³C NMR," *Carbohydrate Polymers*, vol. 58, pp. 409-416, 12/7/ 2004.
- [58] T. Winie and A. K. Arof, "FT-IR studies on interactions among components in hexanoyl chitosan-based polymer electrolytes," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 63, pp. 677-684, 3// 2006.
- [59] D. E. Chung, H. H. Kim, M. K. Kim, K. H. Lee, Y. H. Park, and I. C. Um, "Effects of different Bombyx mori silkworm varieties on the structural characteristics and properties of silk," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 79, pp. 943-951, 8// 2015.
- [60] M. M. R. Khan and M. Tsukada, "5 - Electrospun silk sericin nanofibers for biomedical applications," in *Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, S. C. Kundu, Ed., ed: Woodhead Publishing, 2014, pp. 125-156.
- [61] A. MURPHY, I. ROMERO, and W. Washington, "Biochemical and biophysical properties of native Bombyx mori silk for tissue engineering applications," *Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, p. 219, 2014.
- [62] J. Zawadzki and H. Kaczmarek, "Thermal treatment of chitosan in various conditions," *Carbohydrate Polymers*, vol. 80, pp. 394-400, 4/12/ 2010.
- [63] H. Kweon, I. C. Um, and Y. H. Park, "Structural and thermal characteristics of Antheraea pernyi silk fibroin/chitosan blend film," *Polymer*, vol. 42, pp. 6651-6656, 7// 2001.
- [64] P. A. L. Lima, C. X. Resende, G. D. de Almeida Soares, K. Anselme, and L. E. Almeida, "Preparation, characterization and biological test of 3D-scaffolds based on chitosan, fibroin and hydroxyapatite for bone tissue engineering," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 33, pp. 3389-3395, 8/1/ 2013.
- [65] J. Li, L.-P. Zhang, F. Peng, J. Bian, T.-Q. Yuan, F. Xu, *et al.*, "Microwave-assisted solvent-free acetylation of cellulose with acetic anhydride in the presence of iodine as a catalyst," *Molecules*, vol. 14, pp. 3551-3566, 2009.